

Zur Problematik der kutanen *S. aureus* Besiedlung
in der atopischen Dermatitis – Untersuchungen zu angeborenen
und adaptiven Immunmechanismen -

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Salima Mrabet-Dahbi
aus Kassel

Marburg/Lahn 2006

Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

Zur Problematik der kutanen *S. aureus* Besiedlung in der atopischen Dermatitis

– Untersuchungen zu angeborenen und adaptiven Immunmechanismen –

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

.....Kassel, den..1.02.2006.....

(Ort/Datum)

.....Salima Mrabet-Dahbi.....

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation am

.....2.06.2006.....angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Lingelbach

Zweitgutachter: Prof. Dr. Renz

Tag der mündlichen Prüfung:.....21.07.2006.....

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1.	Die atopische Dermatitis.....	1
1.1.1.	Definition & Terminologie.....	1
1.1.2.	Epidemiologie & „Hygiene Hypothese“	1
1.1.3.	Genetischer Hintergrund.....	2
1.1.4.	Diagnostik.....	2
1.1.5.	Klinische Symptomatik & histologische Merkmale.....	3
1.1.6.	Klassifizierung der AD nach pathophysiologischen Kriterien.....	4
1.2.	Immunopathogenese der atopischen Dermatitis.....	5
1.2.1.	Die T-Zell Immunantwort: Priming, Differenzierung & Funktion.....	5
1.2.2.	Zelluläre & immunologische Ereignisse in der atopischen Dermatitis.....	7
1.2.3.	Das T _H 1/T _H 2 Paradigma der atopischen Dermatitis.....	9
1.3.	<i>Staphylococcus aureus</i> als Pathogenitätsfaktor der AD.....	11
1.3.1.	Besiedlung & allgemeiner Zusammenhang zur Erkrankung.....	11
1.3.2.	Einfluss staphylogener Enterotoxine auf den Verlauf der AD.....	12
1.4.	Mechanismen des Immunsystems zur Pathogenabwehr.....	13
1.4.1.	Grundlagen des Immunsystems.....	13
1.4.2.	Die humorale Immunität: Antikörper Isotypen & Subklassen.....	14
1.4.3.	Humane Toll-like Rezeptoren als klassische Beispiele für PRRs.....	14
1.5.	Die duale Funktion von TLR-2 bezüglich Pathogenabwehr & Mani- festation der T_H1/T_H2 Antwort.....	16
1.5.1.	Die TLR-2 vermittelte Abwehr von <i>S. aureus</i>	16
1.5.2.	Die T _H 1 sowie T _H 2 polarisierenden Eigenschaften von TLR-2.....	16
1.6.	Problemstellung, Hypothesen und Zielsetzung der Arbeit.....	18
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1.	Patienten & Datenerhebung.....	20
2.1.1.	Studienkollektiv: Alter & Schweregrad des Ekzems.....	20
2.1.2.	Anzucht & Nachweis von <i>S. aureus</i> aus den Hautabstrichen.....	21
2.1.3.	Nachweis der von <i>S. aureus</i> sezernierten Enterotoxine.....	21
2.1.4.	Bestimmung von Gesamt-IgE & spezifischen IgE Antikörpern im Se- rum.....	22
2.2.	Charakterisierung der adaptiven Immunantwort in der AD.....	22
2.2.1.	Nephelometrische Bestimmung der IgG-Subklassen.....	22

2.2.2.	Bestimmung von anti-SEB/SEC1 IgG1, IgG2 & IgG4 mittels ELISA.....	23
2.2.3.	Bestimmung von PCP-spezifischen IgG2 Antikörpern mittels ELISA.....	24
2.2.4.	Isolierung von PBMCs aus Patienten mit/ohne anti-SEC1 IgG2 Defizienz & Restimulation mit staphylogenen Komponenten.....	25
2.2.5.	Analyse des Zytokinprofils nach dem Cytometric Bead Array System.....	27
2.2.6.	Protein A-Affinitätschromatographie zur Gewinnung einer IgG-Fraktion.....	28
2.2.7.	Analyse der IgG-Fraktion im ³ [H] Thymidin Proliferationstest.....	30
2.3.	TLR SNPs in der AD & in-vitro Untersuchungen der Mutationen.....	32
2.3.1.	Genotypisierung von TLR-2 und TLR-4 SNPs im Serum der AD Patienten.....	32
2.3.2.	Zielgerichtete Mutagenese zur Generierung mutierter TLR-2 Konstrukte.....	35
2.3.3.	Transformation von mutierter Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> XL10-Gold.....	37
2.3.4.	Isolierung von mutierter Plasmid-DNA im analytischen Maßstab.....	39
2.3.5.	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Plasmid-DNA.....	40
2.3.6.	Präzipitation von DNA & Nachweis der Mutation durch Sequenzierung.....	40
2.3.7.	Isolierung von mutierter Plasmid-DNA im präparativen Maßstab.....	41
2.3.8.	Kultivierung & Mykoplasmentest von HEK293 Zellen.....	42
2.3.9.	Transiente Transfektion von HEK293 mit Wildtyp (wt) und mutiertem (mt) TLR-2 Konstrukt mittels Lipofektion.....	45
2.3.10.	Luciferase Assay.....	48
2.3.11.	IL-8 & IP-10 ELISA.....	49
2.4.	Zur Lokalisation von TLR-2 auf CD4⁺ T-Zellen und dem möglichen direkten Einfluss der TLR-2 Liganden auf die T-Zelleffektorfunktion.....	50
2.4.1.	Selektion von CD4 ⁺ T-Zellen aus PBMCs mittels magnetischer „Dynalbeads“ & die daran anschließende Kultivierung.....	50
2.4.2.	Nachweis von TLR-2 auf CD4 ⁺ T-Zellen durch FACS Analyse.....	52
2.4.3.	RNA Isolierung mittels RNeasy & Reverse Transkription.....	54
2.4.4.	HotStarTaq PCR zum qualitativen Nachweis der zu untersuchenden Transkripte in CD4 ⁺ T-Zellen.....	56
2.4.5.	Elektrophoretische Auftrennung und Detektion von Nukleinsäuren.....	57
2.4.6.	Aufreinigung der Amplifikate zwecks Generierung externer Standards.....	58
2.4.7.	Relative Quantifizierung der zur cDNA umschriebenen GATA-3, t-bet, IL-13 und IL-2 Transkripte mittels LightCycler.....	59
2.5.	Statistik.....	61
3.	ERGEBNISSE.....	62
3.1.	Das untersuchte Patientenkollektiv ist zu einem Großteil mit <i>S. aureus</i> besiedelt und gegen Superantigene sensibilisiert.....	62

3.1.1.	Das Profil der kutanen <i>S. aureus</i> Besiedlung & der Zusammenhang zur Erkrankung.....	62
3.1.2.	Das Superantigen-spezifische IgE Profil der Patienten & die Assoziation zur atopischen Dermatitis.....	63
3.2.	Im Vergleich zum Kontrollkollektiv ist die adaptive Immunantwort bei einer Gruppe von AD Patienten verändert bzw. gestört.....	64
3.2.1.	Patienten mit kutaner <i>S. aureus</i> Besiedlung weisen keine IgG-Subklassendefizienz auf.....	64
3.2.2.	Fast die Hälfte der AD Patienten leidet unter einer IgG2 Defizienz gegenüber das Staphylokokken Enterotoxin C1 (SEC1).....	65
3.2.3.	Die α -SEC1 IgG2 Defizienz beschränkt sich ausschließlich auf Superantigen-spezifische Antikörper der IgG2 Subklasse.....	67
3.2.4.	Die α -SEC1 IgG2 defizienten Patienten zeigen eine unbeeinträchtigte Synthese anderer antigenspezifischer IgG2 Antikörper.....	68
3.2.5.	Patienten ohne SEC1 spezifische IgG2 Antikörper besitzen eine normale Kapazität zur Bildung aller IgG-Subklassen.....	68
3.2.6.	Patienten mit α -SEC1 IgG2 Defizienz reagieren nach SEC1 Restimulation der PBMCs mit einer T_H2 -Antwort und leiden unter einem mittelschweren bis schweren Ekzem.....	69
3.2.7.	Die Neutralisierung einer SEC1 induzierten T-Zellantwort durch IgG Antikörper der Patienten ist im Vergleich zu denen der Kontrollen deutlich erschwert.....	71
3.3.	Das häufige Auftreten der heterozygoten TLR-2 R753Q Mutation in der atopischen Dermatitis & die mögliche funktionelle Relevanz.....	72
3.3.1.	AD Patienten tragen vermehrt bekannte TLR-2/4 SNPs im Vergleich zu den Kontrollen...	72
3.3.2.	AD Patienten mit der heterozygoten TLR-2 R753Q Mutation zeigen ein partielles Risiko zur kutanen <i>S. aureus</i> Besiedlung	73
3.3.3.	Die heterozygote TLR-2 R753Q Mutation geht mit einer schweren Verlaufsform der atopischen Dermatitis einher.....	74
3.3.4.	Die LTA vermittelte Antwort ist in-vitro abhängig von der Dosis des Wildtyp bzw. mutierten R753Q TLR-2 Konstrukts.....	75
3.3.5.	Die NF κ B Antwort der homozygoten und heterozygoten R753Q Mutante ist abhängig vom TLR-2 Stimulus.....	76
3.3.6.	Die heterozygote TLR-2 R753Q Mutante hat eine verminderte IL-8 Sekretion zur Folge...	78
3.3.7.	Die IP-10 Produktion bleibt von der heterozygoten TLR-2 R753Q Mutation unbeeinflusst.....	79
3.3.8.	Die durch <i>S. aureus</i> vermittelte IL-8 Antwort ist bei der heterozygoten TLR-2 R753Q Mutation deutlich reduziert.....	79

3.4.	Staphylogene Komponenten können direkt mit T-Zellen über TLR-2 interagieren.....	81
3.4.1.	CD4 ⁺ T-Zellen exprimieren TLR-2 nach vollständiger T-Zellaktivierung.....	81
3.4.2.	Die TLR-2 Expression ist restringiert auf aktivierten T-Zellen des Memory-Phänotyps.....	81
3.4.3.	LTA bedingt bei gleichzeitiger T-Zellaktivierung eine verminderte TLR-2 Expression.....	82
3.4.4.	Die TLR-2 und TLR-6 Expression in CD4 ⁺ T-Zellen bleibt auf mRNA Ebene unbeeinflusst.....	83
3.4.5.	MALP-2 induziert dosisabhängig die Sekretion von T _H 1 Zytokinen in aktivierten CD4 ⁺ T-Zellen und wirkt somit proinflammatorisch.....	85
3.4.6.	Auf mRNA Ebene ist MALP-2 partiell mit einem T _H 1-Phänotyp assoziiert.....	85
4.	DISKUSSION.....	89
4.1.	Die adaptive Immunantwort trägt zur Pathogenese der atopischen Dermatitis bei.....	89
4.2.	Die heterozygote TLR-2 R753Q Mutation gilt als weiteres Merkmal der atopischen Dermatitis & ist mit einer schweren Verlaufsform der Erkrankung assoziiert.....	94
4.3.	<i>S. aureus</i> könnte zur lokalen Entzündung und zur T _H 1-vermittelten Chronifizierung des Ekzems beitragen, indem es direkt mit T-Zellen über TLR-2 interagiert.....	99
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	103
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	106
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	114
8.	PUBLIKATIONEN.....	116
	DANKSAGUNG.....	
	LEBENS LAUF.....	

1. EINLEITUNG

1.1. Die atopische Dermatitis

1.1.1. Definition & Terminologie

Die atopische Dermatitis (AD) ist ein heterogenes Krankheitsbild mit multiplen ursächlichen bzw. auslösenden Faktoren. Es handelt sich hier um eine chronisch rezidivierende, nicht-kontagiöse Dermatose, die durch persistierende trockene und juckende Haut gekennzeichnet ist. Der Begriff „Atopie“ unterstreicht dabei die familiär auftretende Neigung für allergische Erkrankungen (allergisches Asthma bronchiale, allergische Rhinokonjunktivitis, atopisches Ekzem) basierend auf der Überempfindlichkeit von Haut und Schleimhäuten gegenüber Umweltstoffen in Assoziation mit einer erhöhten IgE-Synthese, den Schlüsselmolekülen allergischer Erkrankungen.⁽¹⁾

1.1.2. Epidemiologie & „Hygiene Hypothese“

Etwa 1-3% aller Erwachsenen sowie 10-20% aller Kinder leiden an der atopischen Dermatitis⁽²⁾, deren Prävalenz seit dem 2. Weltkrieg in Industrienationen stetig zugenommen hat.⁽³⁾ Hierfür werden vor allem die Besonderheiten des westlichen Lebensstils verantwortlich gemacht. Aufgrund verbesserter hygienischer Verhältnisse sowie moderner Impfprogramme hat sich zwar die Inzidenz infektiöser Erkrankungen im frühen Kindesalter deutlich vermindert, dafür jedoch das Atopierisiko in der Bevölkerung kontinuierlich erhöht. Die sogenannte „Hygiene-Hypothese“ geht von einem direkten Zusammenhang dieser beiden Phänomene aus und postuliert, dass der verminderte Kontakt zu mikrobiellen Erregern die Manifestation atopischer Erkrankungen begünstigt.⁽⁴⁾

Gestützt wird diese These durch eine Reihe von epidemiologischer und experimenteller Daten. So konnte bei Kindern mit anthroposophischen Lebensumständen eine niedrige Prävalenz von atopischen Erkrankungen beobachtet werden, die u. a. mit dem höheren Verzehr von lactobacillushaltiger Nahrung assoziiert war.⁽⁵⁾ Versuche am murinen Modell haben ergeben, dass apathogene Lactobazillen eine Antigen-induzierte IgE-Produktion durch von Makrophagen sezerniertes IL-12 inhibieren⁽⁶⁾, da eine T_H1-gerichtete Immunantwort - dem Gegenpart zur allergischen, T_H2-getriggerten Immunreaktion (s. Abschnitt 1.2.1.), gefördert wird.

1.1.3. Genetischer Hintergrund

Die genetische Prädisposition der atopischen Dermatitis lässt sich aus einer positiven Familienanamnese für Atopie in ungefähr zwei Drittel aller AD Patienten ableiten. Sind beide Elternteile von der Erkrankung betroffen, so schätzt man die Vererbungswahrscheinlichkeit auf ca. 70% und bei einem Elternteil mit Atopie auf 25 bis 30%.⁽⁷⁾ Obwohl der Vererbungsmodus noch nicht in allen Einzelheiten geklärt ist, kann man inzwischen von einer polygenen Weitergabe der atopischen Diathese ausgehen, d. h., dass mehrere hauptverantwortliche Atopiegene für die Prädisposition der Erkrankung existieren. Zu solchen zählen die auf den chromosomalen Regionen 11q13 ⁽⁸⁾ und 5q31-33 befindlichen Gene, die für die β -Untereinheit des hochaffinen IgE-Rezeptors (Fc ϵ RI) bzw. für Leitzytokine der T_H2-Antwort (z. B. Interleukin-4) kodieren.⁽⁹⁾ Gemäß vieler humangenetischer Studien tragen Mutationen dieser Gene zu den typischen Immunpathophänomenen der AD (Hyperimmunoglobulinämie E, hohe Serumkonzentrationen von Allergen-spezifischem IgE, Eosinophilie) bei. In diesem Zusammenhang ist z. B. bekannt, dass der -590C/T Polymorphismus des IL-4 Gen-Promotors in Assoziation zur atopischen Dermatitis steht, da aufgrund erhöhter Promotoraktivität eine verstärkte allergische Antwort resultiert.⁽¹⁰⁾

1.1.4. Diagnostik

Entsprechend dem weltweit anerkannten Klassifizierungssystem nach Hanifin und Rajka erfolgt die Diagnose der atopischen Dermatitis **[Tab.1]**, für die mindestens drei Hauptkriterien (massiver Juckreiz, Ekzem in typischer Form und Verteilung, chronischer und/oder rezidivierender Verlauf, positive Eigen- bzw. Familienanamnese) sowie vier Nebenkriterien erfüllt sein müssen.⁽¹¹⁾ Zu letzteren zählen u. a. die erhöhten Serum-IgE Werte, positive Hautreaktionen auf potentielle Allergene in Prick- und Intrakutantest sowie die paradoxen Weißreaktionen auf mechanische (weißer Dermographismus) und chemische (Nikotinsäureester, Methacholinchlorid) Reize.

Tab.1: Diagnosekriterien der atopischen Dermatitis nach Hanifin und Rajka

HAUPTKRITERIEN (MINDESTENS 3):	NEBENKRITERIEN (MINDESTENS 4):
<ul style="list-style-type: none"> • Pruritus (Juckreiz) • Typische ekzematöse Morphologie und Verteilung • Beugenekzeme bei Erwachsenen, Gesicht- und Streckseitenbefall bei Säuglingen und Kindern • Chronischer oder chronisch-rezidivierender Verlauf • Eigen- oder Familienanamnese für Atopie (Asthma bronchiale, Allergische Rhinokonjunktivitis, Atopische Dermatitis) 	<ul style="list-style-type: none"> • Xerose (trockene Haut) • Positive Hauttests vom Soforttyp • Erhöhtes Serum IgE • Bakterielle / virale Hautinfektionen • Chronisches Fußekzem • Chronisches Handekzem • Lichtung der lateralen Augenbrauen • Doppelte Lidfalte • Mamillenekzem • Nahrungsmittelintoleranz • Unverträglichkeit von Wolle • Juckreiz beim Schwitzen • Weisses Dermographismus

1.1.5. Klinische Symptomatik & histologische Merkmale

Interessanterweise variiert das klinische Bild der atopischen Dermatitis sowohl mit dem Alter als auch mit dem Verlauf der Erkrankung [Abb.1]. So dominieren in der infantilen Phase (Säuglingsekzem) nässende und verkrustete Läsionen im Gesicht, die sich im Kindesalter (von zwei bis zwölf Jahren) vorzugsweise auf die Extremitätenbeugen (Kniekehlen und Ellenbeugen), die Hals-Nackenregion sowie auf Hand- und Fußrücken verlagern. Während in der zweiten Phase der Juckreiz als vorherrschendes Symptom gilt, ist die Haut im Erwachsenenalter entzündlich verdickt und weist eine vergrößerte Hautfelderung (Lichenifikation) auf. Chronisch entzündliche Veränderungen mit Papeln an den Beugeseiten der Extremitäten stehen hier im Vordergrund.

Auch das Entzündungsgeschehen selbst verläuft in drei charakteristischen Phasen. So zeigt die klinisch unauffällige Haut aus immunhistologischer Sicht zunächst eine geringfügige T-Zellinfiltration⁽¹²⁾, dafür jedoch die Anwesenheit von dendritischen antigenpräsentierenden Zellen (APC), die an ihrer Oberfläche spezifische IgE-Antikörper tragen. Mit dem Übergang zur akuten Phase äußert sich das Ekzem durch Nässen sowie Bläschenbildung und ist durch eine schwammartige Auflockerung der Epidermis (interzelluläres Ödem/Spongiosa) zusammen mit einer ausgeprägten perivaskulären Infiltration von T-Zellen, Monozyten und Makrophagen charakterisiert. Das lymphozytäre Infiltrat der Dermis zeigt insbesondere eine Prädominanz von CD4⁺CD45RO⁺ aktivierten Memory T-Zellen (Gedächtniszellen) und spiegelt somit vorangegangenen Antigenkontakt

wider.⁽¹³⁾ Als weiteres Charakteristikum der akuten Phase gilt die Anwesenheit von Mastzellen in unterschiedlichen Degranulationsstadien. Feine Schuppung, blassere Rötung, Krustenbildung, Lichenifikation sowie Akanthose (Epidermisverdickung) prägen hingegen das Erscheinungsbild im chronischen Stadium. Das zelluläre Infiltrat dieser Hautläsionen besteht im wesentlichen aus IgE-tragenden dendritischen APCs, nicht-aktivierten Mastzellen sowie höheren Anteilen von eosinophilen Granulozyten.



Abb.1:

Klinische Symptomatik (obere Reihe) und histologische Veränderungen (untere Reihe) im Verlauf der akuten und chronischen Phase der AD.

Das histologische Bild zum chronischen Stadium zeigt deutlich die Epidermisverdickung. Modifiziert nach: Leung DYM und Bieber T. Atopic dermatitis. Lancet 2003;361:151-60; Ref.¹⁴

1.1.6. Klassifizierung der AD nach pathophysiologischen Kriterien

Verschiedene pathophysiologische Mechanismen lassen eine weitere Gliederung der atopischen Dermatitis zu.⁽¹⁵⁾ So liegt bei einem Großteil der Betroffenen (etwa 70-80%) eine IgE-vermittelte Sensibilisierung gegenüber Allergenen vor, so dass nach Antigenbedingter Quervernetzung zweier zellständiger IgE-Antikörper, dem sogenannten „bridging“, die Degranulation kutaner Mastzellen mit nachfolgender Initiierung einer Entzündungskaskade eingeleitet wird, zu deren Vermittlern Mediatoren wie Histamin, diverse Prostaglandine, IL-1 β sowie TNF- α gehören. Dahingegen beruht die Sensibilisierung bei ca. 20-30% der Patienten auf dem Influx antigenspezifischer T-Zellen nach Allergenprovokation und ist zudem durch das Fehlen von spezifischem IgE charakterisiert. Folglich kommen in der Pathogenese der atopischen Dermatitis sowohl

die Überempfindlichkeitsreaktion Typ I, die kausal mit der überschießenden IgE-Produktion in Verbindung steht, als auch Typ IV, als deren Effektorzellen die T-Helferzellen (s. Abschnitt 1.2.1.) gelten, zum Tragen. Neben dieser klaren Einteilung existiert außerdem der „gemischte Typ“ der AD, der beide Phänotypen vereint, sowie die Gruppe von Atopikern, die keines der genannten Merkmale aufweist. Hier vermutet man, dass unspezifische Hyperreaktivitätsmechanismen der Haut am Entzündungsgeschehen beteiligt sind.

1.2. Immunopathogenese der atopischen Dermatitis

Die Ursachen der Erkrankung sind multifaktoriell. Neben der erblichen Disposition umfasst der Pathomechanismus primär Störungen der Hautbarrierefunktion sowie eine dysregulierte Immunantwort, die im Folgenden näher dargestellt wird.

1.2.1. Die T-Zell Immunantwort: Priming, Differenzierung & Funktion

Die T-Zellentwicklung im Thymus ist zu Beginn weder durch die Expression von CD4 (cluster of differentiation) noch durch CD8, später jedoch durch die gleichzeitige Expression beider Moleküle charakterisiert. Ebenso umfasst dieses Stadium die somatische Rekombination der Rezeptor-Gensegmente mit der Ausbildung eines vielfältigen Repertoires von bis zu 10^{15} T-Zellrezeptoren (TCR) unterschiedlicher Antigenspezifität⁽¹⁶⁾, dessen Funktionsfähigkeit das Überleben von T-Zellen sichert. Reagieren diese zudem nicht auf körpereigene Antigene, reifen und differenzieren die Zellen schließlich zu CD4⁺-Helfer oder CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen.⁽¹⁷⁾

Da naive T-Zellen Antigene lediglich in den T-Zellzonen der sekundären lymphatischen Organe (Lymphknoten, Peyer's Patches) erkennen, erfordert die Einleitung der Immunantwort den Transport des Antigens vom Ort der Infektion in solche Zonen, vermittelt durch antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen). Unreife dendritische Zellen phagozytieren und prozessieren Antigene und migrieren daraufhin als reife Zellen in die regionalen Lymphknoten, wo sie nun die auf ihrer Oberfläche und an MHC (major histocompatibility complex) gebundenen Antigenfragmente den naiven T-Zellen präsentieren.⁽¹⁸⁾ Weiterhin bestehen innerhalb der MHC Moleküle zwei Klassen, denen Antigene unterschiedlichen Ursprungs zugeteilt sind. So werden Peptide intrazellulärer Pathogene von APCs der MHC Klasse I präsentiert,

während Antigene extrazellulärer Pathogene an MHC Klasse II binden. Die differentielle Erkennung dieser Strukturen wird dabei von den Co-Rezeptoren CD4 und CD8 unterstützt. Demnach erkennen zytotoxische CD8⁺ T-Zellen APCs der MHC Klasse I, während der MHC Klasse II Komplex von CD4⁺ T-Helfer-Zellen erkannt wird.⁽¹⁹⁾

Das erste Zusammentreffen einer naiven T-Zelle mit dem entsprechenden Peptid-MHC-Komplex, das sogenannte *Priming*, reicht jedoch für eine alleinige Aktivierung der T-Zellen nicht aus, was erst durch die Interaktion des B7-Moleküls (CD80 und CD86) der APCs mit den entsprechenden Rezeptoren auf T-Zellen (CD28 und CTLA-4) ermöglicht wird.⁽²⁰⁾ Erst dieses zweite, kostimulatorische Signal bewirkt eine Stabilisierung der IL-2 mRNA und damit eine effektive IL-2 Synthese seitens der T-Zellen⁽²¹⁾, womit deren klonale Expansion induziert wird. Letzteres mündet schließlich in der Ausbildung zweier T-Zelltypen, nämlich den T-Effektorzellen sowie den T-Gedächtniszellen, die anders als naive T-Zellen keine erneute Kostimulation bei spezifischer Antigenerkennung benötigen.

In der Regulation der adaptiven Immunantwort nehmen CD4⁺ T-Helfer-Zellen (T_H-Zellen) eine fundamentale Rolle ein. Nach Aktivierung können sich diese in zwei Subpopulationen unterschiedlicher Funktion aufgrund ihres Zytokinsekretionsprofil entwickeln.⁽²²⁾ Als Leitzytokine von T_H1-Zellen sind vor allem IFN- γ , TNF- α sowie IL-2 bzw. IL-4, IL-5 und IL-13 als Leitzytokine der T_H2-Zellen mit jeweils inhibitorischen Eigenschaften bezüglich der Entstehung der anderen Population zu nennen.^(23,24) Die Polarisierung zu T_H1- bzw. T_H2-Zellen geht dabei aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Determinanten hervor. Somit sind Art, Konzentration sowie Eintrittsroute des Antigens, der APC-Typ aber auch das genetisch bedingte Zytokinemilieu entscheidend.^(25,26) Außerdem steht dieser Vorgang unter dem Einfluss der Affinität des T-Zellrezeptors zum Antigen.⁽²⁷⁾ Dennoch ist wohl die durch den Genotyp beeinflusste Dominanz bestimmter Zytokine für die Ausprägung eines T-Zellphänotyps von größter Bedeutung. Somit ist IL-12 für die initiale Entstehung von T_H1-Zellen essentiell, da keine T_H1-Antwort in IL-12 Knock-out Mäusen generiert werden kann.⁽²⁸⁾ Hohe Allergendosen sowie die Abwesenheit von IL-4 gelten als weitere Voraussetzungen. Im Gegensatz dazu veranlassen IL-4, niedrige Allergendosen sowie das Fehlen von IFN- γ naive T-Zellen zur T_H2-Polarisierung.

Die zwei antagonistischen Zellpopulationen bestimmen nun die Richtung der Immunantwort, deren Konsequenz weitreichend ist. T_H1 spezifische Zytokine vermitteln

hierbei die bakterielle und virale Abwehr, indem sie z. B. durch IFN- γ Sekretion die Expression von MHC Klasse I bzw. II und damit die Makrophagenaktivierung fördern⁽²⁹⁾. Zudem sichert IFN- γ zusammen mit IL-12 die Aufrechterhaltung bereits existierender T_H1-Zellen.⁽³⁰⁾ Im Gegensatz dazu sind T_H2-Zellen auf die B-Zellaktivierung mit anschließender Antikörperproduktion spezialisiert und damit für die humorale Immunität (s. Abschnitt 1.4.2.), aber auch für die Manifestation von Atopie und allergischen Entzündungen verantwortlich.⁽³¹⁾ Das Schlüsselzytokin hierbei ist IL-4, das gemeinsam mit IL-13 und der Interaktion zwischen CD40 auf B-Zellen und dem CD40 Ligand auf T-Zellen den Isotyp-Klassenwechsel von IgM zu IgE veranlasst.⁽³²⁾ Ferner ist IL-4 einer der wichtigsten Differenzierungs- und Aktivierungsfaktoren für Mastzellen und basophile Granulozyten und wirkt damit auch auf Ebene der Effektorzellen. Außerdem führt es zur Hochregulation von VCAM-1, einem wichtigen Adhäsionsmolekül für die Rekrutierung eosinophiler und mononukleärer Zellen.⁽³³⁾ Da IL-4 und IFN- γ sich in ihrer Ausbildung gegenseitig hemmen, wirkt sich eine Verschiebung dieses sensiblen Gleichgewichts nachhaltig aus. Demnach äußert sich eine fehlgesteuerte Aktivierung von T_H2-Zellen in einer ungewöhnlich hohen Produktion von IgE und anderen Mediatoren, die allergische Symptome verursachen.

1.2.2. Zelluläre & immunologische Ereignisse in der atopischen Dermatitis

Die Hautläsionen der atopischen Dermatitis resultieren im allgemeinen aus einem komplexen zellulären und immunologischen Geschehen:

- **T-Zellen:**

T-Zellen spielen in der Pathogenese wohl die wichtigste Rolle, was sich bereits aus ihrer massiven Infiltration in läsionaler Haut der Patienten ableiten lässt. Ihre fundamentale Bedeutung hinsichtlich der Ekzembildung stützt sich zum einen darauf, dass Individuen mit einer primären T-Zelldefizienz nach Knochenmarkstransplantation kurzfristig Hautekzeme entwickeln, umgekehrt im Tiermodell jedoch gezeigt werden konnte, dass sich bei Abwesenheit von T-Zellen keine Ekzemreaktionen entwickeln.⁽³⁴⁾ Innerhalb der atopischen Dermatitis selbst haben erste Untersuchungen im peripheren Blut sowie der Haut der betroffenen Patienten eine Prädominanz von CD4⁺ T-Zellen im Verhältnis zu CD8⁺ T-Zellen und eine daraus resultierende verminderte zytotoxische T-Zellfunktion ergeben.⁽³⁵⁾ Der Aktivierungsgrad der CD4⁺ Population korreliert ferner mit der Schwere der Erkrankung.⁽³⁶⁾ Das Zelladhäsionsmolekül „cutaneous lymphocyte antigen“ (CLA) vermittelt hierbei die gewebspezifische Rekrutierung dieser Zellen, das sogenannte „T-Zellhoming“, nach Eindringen von Fremdantigenen,⁽³⁷⁾ indem es mit E-Selektin und

P-Selektin der dermalen Hautgefäße interagiert.⁽³⁸⁾ In-vitro sezernieren frisch isolierte CLA⁺ T-Zellen von AD Patienten spontan IL-4, IL-5 und IL-13 nicht aber IFN- γ ⁽³⁹⁾, womit funktionell das Überleben der Eosinophilen verlängert und eine IgE-Produktion induziert wird.

- **Antigenpräsentierende Zellen (APCs) & die Rolle von IgE:**

Langerhans-Zellen der Epidermis sind für die Erkennung, Aufnahme und Prozessierung von eindringenden Allergenen in die Haut verantwortlich. Dahingegen nehmen inflammatorische dendritische epidermale Zellen (IDECs) präferentiell bakterielle Komponenten auf und sind, anders als Langerhans-Zellen, durch das Fehlen der charakteristischen Birbeck Granula, dafür jedoch durch die Präsenz des Mannose-Rezeptors CD206 gekennzeichnet.^(40,41) Den Zellen gemeinsam ist die Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors (Fc ϵ RI), der in läsionaler Haut der atopischen Dermatitis stark hochreguliert ist und an dem allergenspezifisches IgE bindet.⁽⁴⁰⁾ Nehmen also dendritische Zellen das Allergen über ihre membranständigen IgE-Moleküle auf („allergen focussing“), so können sie eine weitaus effektivere T-Zellaktivierung induzieren.⁽⁴²⁾ Dieser IgE verstärkte Antigenpräsentationsweg ist für die Ausprägung und Chronifizierung des Krankheitsbildes (mit)verantwortlich, wofür auch die Korrelation zwischen der Höhe des Serum-IgE und der Intensität der Erkrankung spricht.⁽⁴³⁾ Ferner lassen sich Ekzemreaktionen am besten induzieren, wenn Inhalationsallergene auf Hautareale mit IgE-tragenden dendritischen Zellen appliziert werden.⁽⁴²⁾ Verlassen diese Zellen die Epidermis, unterliegen sie einem funktionellen Reifungsprozess und bilden schließlich einen Teil der dermalen dendritischen Zellpopulation (DDCs).⁽⁴⁴⁾

- **Mastzellen & eosinophile Granulozyten:**

Neben Langerhans-Zellen exprimieren auch eosinophile Granulozyten und Mastzellen den hochaffinen IgE-Rezeptor (Fc ϵ RI). Allergen-bedingte Kreuzvernetzung der membranständigen IgE-Moleküle hat die Degranulation von Entzündungsmediatoren zur Folge und führt beispielsweise durch Histaminfreisetzung zu den typischen Krankheitssymptomen wie Rötung und Juckreiz der Haut. Die TNF- α Sekretion durch Mastzellen ermöglicht, ähnlich wie das durch T_H2-Zellen sezernierte IL-4 eine Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1⁽⁴⁵⁾, wodurch eosinophile Granulozyten verstärkt in die Dermis rekrutiert werden und dort das Gewebe durch ihre Proteine MBP (major basic protein) sowie ECP (eosinophil cationic protein) schädigen.

Der Influx dieser Zellen in läsionaler Haut wird zusätzlich durch Eotaxin vermittelt, das nicht nur stark chemotaktisch, sondern auch aktivierend auf eosinophile Granulozyten wirkt.⁽⁴⁶⁾ Während der Exazerbation der atopischen Dermatitis sind die Anzahl der aktivierten und zirkulierenden Eosinophilen sowie das Serum ECP erhöht.⁽⁴⁷⁾ Letzteres korreliert sogar mit dem Schweregrad der Erkrankung⁽⁴⁸⁾ und deutet auf die wichtige Rolle der Eosinophilen als Effektorzellen hin.

- **Keratinocyten:**

Keratinocyten tragen zu einer weiteren T-Zellaktivierung bei. Durch Kratzen der Haut sezernieren sie vermehrt IL-1 und IL-3 und unterstützen damit die Freisetzung von IL-1, TNF- α , Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF) sowie Histamin-Releasing Factor durch Langerhans-Zellen, worüber letztendlich die stärkere T-Zellaktivierung erfolgt. Mit der IFN- γ und TNF- α Produktion durch einwandernde Lymphozyten bzw. durch Keratinocyten selbst wird das Fas-Molekül auf den Keratinocyten hochreguliert.⁽⁴⁹⁾ Interagiert es mit dem auf aktivierten T-Zellen vorhandenen Fas-Liganden, so wird die Apoptose von Keratinocyten und damit die Auflösung spezifischer Haftstrukturen eingeleitet, die zur typischen Auflockerung des Epithelverbandes führt, wie sie für Ekzeme charakteristisch ist.⁽⁴⁹⁾ Außerdem sind Keratinocyten von AD Patienten nicht imstande, antimikrobielle Peptide wie β Defensin-2⁽⁵⁰⁾ und β Defensin-3⁽⁵¹⁾ zu synthetisieren, ein weiteres, erst kürzlich identifiziertes Merkmal der atopischen Dermatitis. Das Fehlen dieser Proteine begünstigt die kutane Besiedlung mit gram-positiven und gram-negativen Bakterien und folglich auch das Entzündungsgeschehen.

1.2.3. Das T_H1/T_H2 Paradigma der atopischen Dermatitis

Die Entzündungsreaktion der atopischen Dermatitis verläuft in zwei Abschnitten, beginnend mit der akuten Phase, der die Chronifizierung der Hautläsionen folgt. An diesen sind T_H1- und T_H2-Zellen in sequentieller Aktivierung beteiligt. Nach heutigem Erkenntnisstand ist die akute Phase aufgrund der Prädominanz von IL-4 und IL-13 dem T_H2-Phänotyp zuzuordnen.⁽⁵²⁾ Allergenexposition und T_H2-abhängige Effektormechanismen sind Ursache für die hier vorliegende Entzündungsreaktion. In chronisch läsionaler Haut hingegen dominieren IL-5, GM-CSF, IL-12 und IFN- γ parallel mit dem Influx von Eosinophilen und Makrophagen.⁽⁵²⁾ Tierexperimentelle Untersuchungen konnten dabei mehrfach die Wichtigkeit beider Zytokinklassen im Verlauf der Ekzemreaktion belegen.

So entwickeln IL-4 transgene Mäuse die für die akute Phase typischen juckenden Hautläsionen⁽⁵³⁾, während die Dermis von IFN- γ Knock-out Mäusen deutlich dünner ist.⁽⁵⁴⁾

Das ursprüngliche Konzept der atopischen Dermatitis als einer T_H2-vermittelten Dermatose wurde insbesondere durch in-vitro Versuche an PBMCs gestützt, die nach mitogener Stimulation präferentiell IL-4 sezernierten.⁽⁵⁵⁾ Auch bei Allergen-spezifischen T-Zellen bestand eine Dominanz der IL-4 Sekretion nach spezifischer Stimulation.⁽⁵⁶⁾ Inzwischen ist bekannt, dass diese Prädominanz von IL-4 lediglich in der Initialphase der AD von essentieller Bedeutung ist und daher das T_H2-Profil dieses Stadiums definiert, welches u. a. auch durch die Keratinozytenfunktion beeinflusst wird. Zu den wohl wichtigsten Mediatoren dieser Zellen zählt das Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), welches in der atopischen Dermatitis signifikant erhöht ist.⁽⁵⁷⁾ So lassen TSLP aktivierte dendritische Zellen (DCs) naive T-Zellen präferentiell zum T_H2-Phänotyp heranreifen.

Eosinophile, deren Überlebensdauer aufgrund des vermehrten IL-5 verlängert wird⁽⁵⁸⁾, können nun interessanterweise nach IL-4 Stimulation biologisch aktives IL-12 sezernieren.⁽⁵⁹⁾ Dies könnte den Übergang von akuter zur chronischen Phase auslösen, da IL-12 als Schlüsselzytokin der IFN- γ Synthese und damit für die Entstehung von T_H1-Zellen gilt. Tatsächlich lässt sich in chronisch läsionaler Haut sowohl immunhistologisch als auch bei den daraus isolierten Milbenallergen-spezifischen T-Zellen im Gegensatz zur akuten Phase ein typisches IFN- γ Expressionsprofil nachweisen.⁽⁶⁰⁾ Abbildung 2 zeigt eine Zusammenfassung der wichtigsten zellulären und immunologischen Vorgänge, die u. a. zum T_H2/T_H1 Phänomen der akuten und chronischen Phase beitragen.

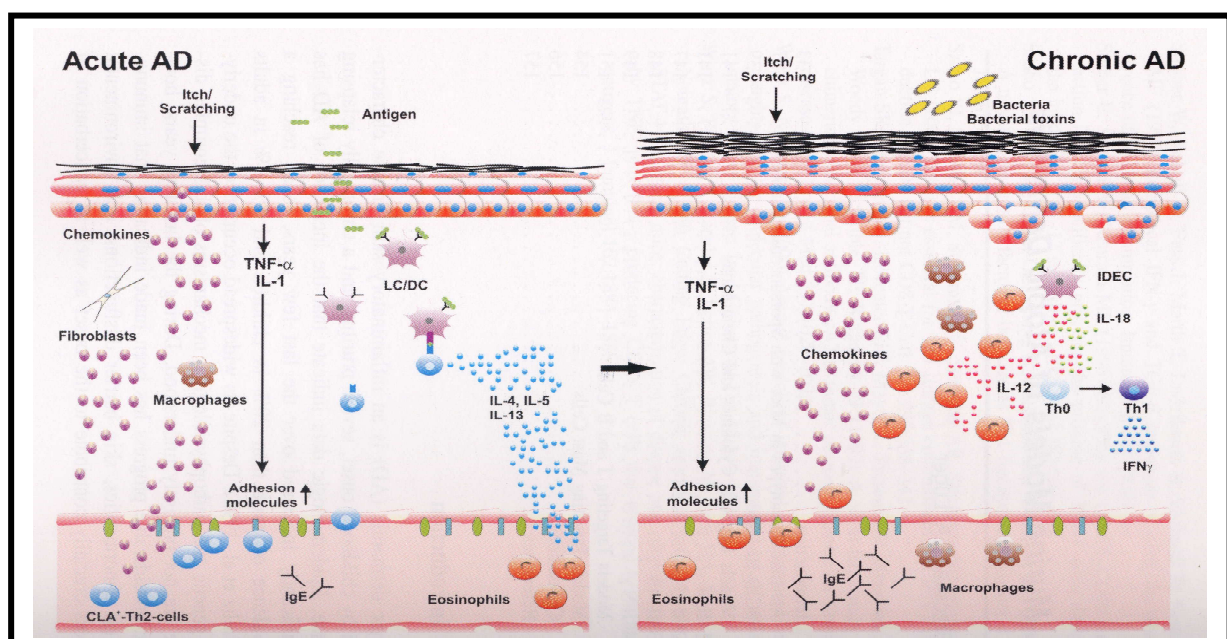


Abb.2:

Zelluläre und immunologische Ereignisse in akuter und chronisch läsionaler Haut unter besonderer Berücksichtigung des biphasischen Zytokinprofils. Nach: Brzoska T und Luger TA. Murine Models of Atopic Dermatitis. In: Animal Models of T Cell Mediated Skin Diseases. Heidelberg: Springer Verlag, 2005:133-66; Ref.⁶¹

1.3. *Staphylococcus aureus* als Pathogenitätsfaktor der AD

1.3.1. Besiedlung & allgemeiner Zusammenhang zur Erkrankung

Normalerweise schützt eine residente Bakterienflora gesunde Haut vor der Besiedlung und Invasion durch pathogene Keime, indem sie ihrer Vermehrung entgegenwirkt. Auch der Fettsäuremantel der Haut trägt zur unspezifischen Resistenz bei. Die Hautbarrierefunktion der Patienten mit atopischer Dermatitis ist jedoch gestört und resultiert in einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber bakteriellen und viralen Hautinfektionen sowie Mykosen. Dabei ist insbesondere die Bedeutung des Keims *Staphylococcus aureus* in den Mittelpunkt der Forschung gerückt, der erheblich zur Exazerbation des Krankheitsverlaufs beiträgt. Eine kutane Besiedlung mit diesem Erreger besteht bei mehr als 80% der Patienten⁽⁶²⁾, wobei *S. aureus* aus ekzematöser und normal erscheinender Haut, sowie aus akuten und chronischen Läsionen isoliert werden kann.⁽⁶³⁾ Im Gegensatz dazu liegt die kutane *S. aureus* Besiedlung bei hautgesunden Individuen bei weniger als 5%. Die Kolonisierungsdichte ohne klinische Anzeichen einer Superinfektion, die durch Pusteln, gelbliche Krusten und nässende Hautveränderungen gekennzeichnet ist, kann dabei bis zu 10^7 koloniebildende Einheiten (CFU) pro cm^2 Haut betragen⁽⁶²⁾, und korreliert darüber hinaus mit dem Schweregrad des Ekzems.⁽⁶⁴⁾ Die erhöhte Suszeptibilität gegenüber *S. aureus* geht vor allem auf das T_H2 -gesteuerte Entzündungsgeschehen des akuten Stadiums zurück. Hier konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* präferentiell in Hautarealen mit T_H2 dominierter Entzündung bindet⁽⁶⁵⁾ und umgekehrt eine bakterielle Besiedlung in IL-4 Knock-out Mäusen ausbleibt. Der dafür verantwortliche Mechanismus beruht auf der durch IL-4 induzierten Expression von epidermalen und dermalen Fibronectin sowie Laminin.⁽⁶⁶⁾ Kratzen der Haut als Folgeerscheinung des Juckreizes, welches selbst durch die T_H2 -getriggerten Effektormechanismen ausgelöst wird, bedingt die Freisetzung dieser Proteine und ermöglicht somit deren Interaktion mit entsprechenden Rezeptoren (Adhäsine) auf staphylogenen Zellwänden. *S. aureus* Stämme, die für Fibronectin-bindendes Protein defizient sind, können deshalb nur noch in abgeschwächter Form an die Haut binden.⁽⁶⁵⁾

Die klinische Relevanz dieser Keime in der atopischen Dermatitis wird insbesondere durch die Tatsache untermauert, dass eine anti-staphylogene Behandlung zu einer deutlichen Besserung des Hautzustandes bei einem Großteil der Patienten führt, auch wenn eine vollständige Eradikation mit dauerhafter Abheilung der Läsionen bislang nicht erzielt werden konnte.⁽⁶⁷⁾

1.3.2. Einfluss staphylogener Enterotoxine auf den Verlauf der AD

Als ein weiteres Charakteristikum von *S. aureus* gilt die Produktion der Staphylokokken Enterotoxine A-E (SEA-E) bzw. des Toxischen Schocksyndrom-Toxins-1 TSST-1 in 30-65% der isolierten Stämme⁽⁶⁸⁾, wodurch die kutane Inflammation maßgeblich gefördert wird.⁽⁶⁴⁾ Das pathogene Potential dieser Toxine ist dabei mit ihrer Eigenschaft als Superantigene verbunden, die sich von konventionellen Antigenen dahingehend fundamental unterscheiden, dass sie keiner Prozessierung und Präsentation durch MHC II bedürfen, sondern direkt an bestimmte Abschnitte der V β -Kette des TCR binden.⁽⁶⁹⁾ Auf diese Weise können sie bis zu 20% der peripheren T-Zellen unabhängig deren Antigenpezifität polyklonal aktivieren und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine induzieren⁽⁷⁰⁾, wobei jedes Superantigen eine spezifische V β -Region bindet [Tab.2]. Im Vergleich dazu wird ein konventionelles Allergen nur von jeder 10⁴ bis 10⁵ -ten T-Zelle spezifisch erkannt. Der Arbeitsgruppe um Strickland et al. gelang es, den direkten Zusammenhang zwischen der Besiedlung mit toxischen *S. aureus* Stämmen und der Expansion von CLA⁺ T-Zellen im peripheren Blut nachzuweisen, deren T-Zellrezeptoren die für die jeweiligen Superantigene spezifische V β -Ketten besaßen.⁽⁷¹⁾ Analog dazu zeigen Hautbiopsien aus SEB-behandelten Arealen ebenso eine selektive Anhäufung von T-Zellen mit passenden TCR-V β Elementen.⁽⁷²⁾ Die kutane Superantigenexposition führt zu einer sehr raschen und stark entzündlichen Reaktion im exponierten Areal⁽⁷³⁾. Die Bedeutung wird zudem aus in-vitro Studien am Beispiel von SEB ersichtlich. Eine Stimulation mit dem genannten Superantigen resultiert in einer verstärkten IL-4 und IL-5 Produktion in den aus AD Patienten gewonnenen PBMCs.⁽⁷⁴⁾ Außerdem haben in-vitro Studien ergeben, dass Superantigene die IL-12 Produktion in dendritischen Zellen und Makrophagen induzieren⁽⁷⁵⁾, die somit neben Eosinophilen am Übergang von akuter zur chronischen Phase beteiligt sein können. Zusätzlich zur klassischen Funktion konnten Leung und Mitarbeiter erstmals zeigen, dass staphylogene Enterotoxine auch als konventionelle Antigene fungieren und eine spezifische IgE-Synthese induzieren. In-vitro bewirken sie eine IgE-vermittelte Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten der entsprechenden sensibilisierten AD Patienten.⁽⁷⁶⁾ Die Präsenz von Superantigen-

spezifischem IgE führt dabei nicht nur zu einer viel stärkeren Ausprägung der Erkrankung im Vergleich zu nicht sensibilisierten Patienten⁽⁷⁷⁾, sondern ist zudem mit dem Schweregrad des Ekzems assoziiert.⁽⁷⁸⁾

Tab.2: Superantigene und ihre reaktiven TCR-V β Elemente⁽⁷⁹⁾

SUPERANTIGEN	INTERAGIERENDE V β -SEGMENTE
SEA	1.1 ; 5.3 ; 6.3 ; 6.4 ; 6.9 ; 7.3 ; 7.4 ; 9.1 ; 18
SEB	3 ; 12 ; 14 ; 15 ; 17 ; 20
SEC1	12
SEC2	12 ; 13.2 ; 14 ; 15 ; 17 ; 20
SEC3	5 ; 12 ; 13.2
SED	5 ; 12
SEE	5.1 ; 6.3 ; 6.4 ; 6.9 ; 8.1 ; 18
TSST-1	2

1.4. Mechanismen des Immunsystems zur Pathogenabwehr

1.4.1. Grundlagen des Immunsystems

Das Immunsystem der Vertebraten hat sich im Laufe der Evolution in zwei Subsysteme entwickelt, das angeborene sowie das adaptive Immunsystem. Erst das Zusammenspiel beider hochdifferenzierter Abwehrsysteme sichert eine effiziente Pathogenerkennung und schützt den Organismus vor Infektionserregern. Dabei ist das angeborene Immunsystem phylogenetisch älter und bildet eine erste Barriere gegenüber eindringenden Pathogenen, gleichwohl ein vollständiger Schutz gegenüber allen Erregern nicht gegeben ist. Es umfasst z. B. das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme, sowie Mediatoren wie Interferone und Interleukine. Auf der zellulären Seite sind vor allem das Makrophagen-Monozyten-System, die Granulozyten und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zu nennen, deren Immunabwehr auf der Erkennung hochkonservierter, pathogenspezifischer Strukturen, die sogenannten PAMPs (pathogen associated molecular patterns) durch die entsprechenden „pattern recognition receptors“ (PRRs) basiert. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem zeichnet sich das adaptive Immunsystem, das lediglich bei Wirbeltieren zu finden ist, durch Antigenpezifität, einer Rezeptorvielfalt und der Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Es gliedert sich in eine zelluläre, durch T-Zellen vertretene Komponente und eine humoralen Komponente, deren Effektorzellen die B-Zellen sind. Beide Zelltypen haben jeweils einen

spezifischen Rezeptor für die Erkennung von Antigenen. Dabei ist eine klonale Expansion der Lymphozyten nach Antigenstimulation für eine effektive Immunantwort unabdingbar, benötigt jedoch drei bis fünf Tage. Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems überbrücken die Pathogenabwehr in dieser Zeit.

1.4.2. Die humorale Immunität: Antikörper Isotypen & Subklassen

Die Grundstruktur der Antikörper ist einheitlich, bestehend aus zwei identisch schweren „H(heavy)-Ketten“ und zwei identisch leichten „L(light)-Ketten“. Strukturelle Unterschiede innerhalb der schweren Kette lassen eine weitere Einteilung in fünf Isotypen zu, nämlich IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. In der Regel induziert der erste Antigenkontakt mit dem B-Zellrezeptor, der sich aus IgM und IgD zusammensetzt, eine Sekretion der IgM Antikörper. Später wird durch T-Zellinteraktion unter Beibehaltung der F_{ab}-Region und damit der Antigenspezifität, aber durch Transkription einer anderen schweren Kette der Isotypenwechsel zum IgG eingeleitet. Dieser Isotyp macht im Serum mit 75% den größten Anteil aller Immunglobuline aus und ist im Vergleich zum IgM durch eine viel höhere Affinität zum Antigen charakterisiert. Zudem sorgt es beim Neugeborenen aufgrund der Plazentagängigkeit und der intestinalen Resorption aus der Muttermilch für einen vorläufigen immunologischen Schutz bis zur Reifung der eigenen adaptiven Abwehr.

Innerhalb des IgG Moleküls können aufgrund unterschiedlicher Anzahl und Verteilung der Disulfidbrücken zwischen der F_{ab}-Region und dem F_c-Teil vier weitere Subklassen (IgG1-IgG4) definiert werden, die je nach Struktur des Antigens, seiner Dosis und Expositionsfrequenz vorliegen. Sie verfügen alle über die Fähigkeit der Pathogenneutralisierung, indem sie durch direkte Besetzung von Bindungsstellen die Infektion der Zielzelle verhindern. Markieren die Antikörper dahingegen den Erreger (Opsonierung), so können sie entweder durch Bindung an entsprechende Fcγ-Rezeptoren der mononukleären Zellen die Phagozytose einleiten, oder schließlich durch Aktivierung des Komplementsystems die Lyse des Erregers induzieren.

1.4.3. Humane Toll-like Rezeptoren als klassische Beispiele für PRRs

Toll wurde erstmalig in *Drosophila melanogaster* als ein für die dorsoventrale Polarisation der Ontogenese entscheidendes Gen identifiziert.⁽⁸⁰⁾ Später stellte sich auch die Bedeutung der durch Toll kodierten und verwandten Proteingene für die angeborene Immunantwort in *Drosophila* heraus. So werden antifungale und antimikrobielle Proteine nach Aktivierung von mindestens zwei Mitgliedern der Toll-Rezeptorfamilie induziert: dToll

und 18-wheeler.⁽⁸¹⁾ 1997 identifizierten Medzhitov et al das erste humane Toll-Homolog, den sogenannten Toll-like Rezeptor-4⁽⁸²⁾, wobei mittlerweile elf solcher Rezeptoren beschrieben sind. Diese werden vorwiegend auf Zellen des angeborenen Immunsystems (Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen) exprimiert, zu geringem Ausmaß auch auf epithelialen und endothelialen Zellen. Bis dato sind für fast alle TLRs entsprechende, zumeist mikrobielle Liganden bekannt [Abb.3]. Dabei wird durch Rezeptorheterodimerisierung das Repertoire an detektierbaren PAMPs (pathogen associated molecular pattern) zusätzlich erhöht.⁽⁸³⁾

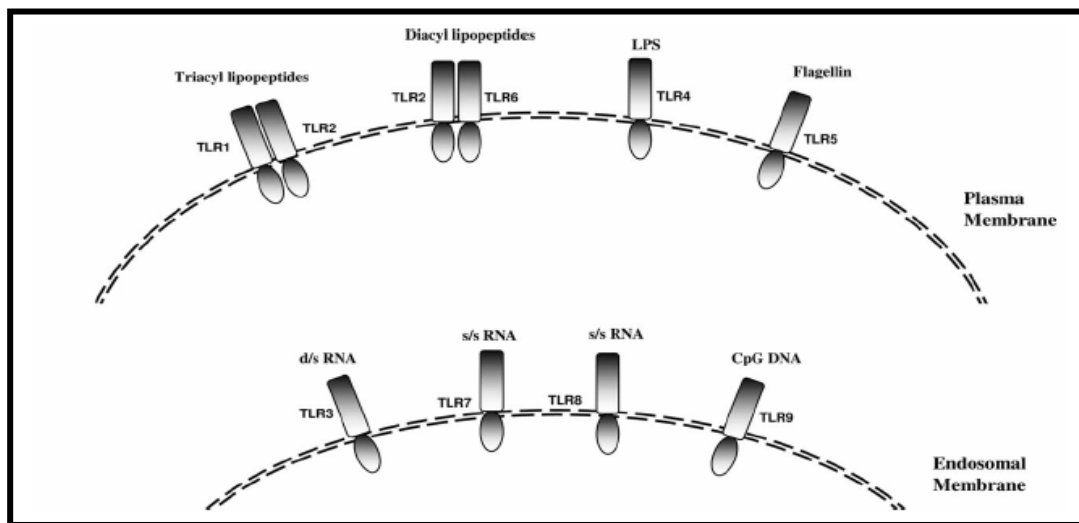


Abb.3: Übersicht der bisher identifizierten humanen TLRs, deren Lokalisation & Liganden.

Nach: Dunne A und O'Neill LAJ. Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. FEBS Letters 2005; 579:3330-5; Ref.⁸⁴

Allen TLRs gemeinsam ist eine leucinreiche extrazelluläre Domäne, die für die Pathogenerkennung zuständig ist. Die intrazelluläre Domäne vermittelt hingegen die Signaltransduktion und weist neben den Toll homologen Sequenzabschnitten eine große Ähnlichkeit zum IL-1 Rezeptor auf, weshalb diese Region auch Toll/IL-1R (TIR) Domäne genannt wird. In den meisten Fällen interagiert die TIR-Domäne mit dem Adapterprotein MyD88 (myeloid differentiation factor 88),⁽⁸⁵⁾ wodurch IRAK (interleukin-1 receptor associated kinase) rekrutiert wird und durch Autophosphorylierung die Oligomerisierung von TRAF-6 zur Folge hat. Dies wiederum bedingt die Phosphorylierung von I κ B und damit dessen Degradation, die letztendlich in der Freisetzung von NF κ B (nuclear factor kappa B), dem Transkriptionsfaktor der „inflammatorischen Basisantwort“, resultiert. Die Bindung von ECSIT (evolutionary conserved intermediate in Toll pathway) an TRAF-6 führt jedoch zur Aktivierung der MAP-Kinasen und somit zur Freisetzung der

Transkriptionsfaktoren AP-1 und ELK-1.⁽⁸⁶⁾ Neben MyD88 ist zusätzlich das Adapterprotein „TIR domain containing adapter protein“ (TIRAP/Mal) zumindest bei TLR-2 und TLR-4 für die Induktion proinflammatorischer Zytokine via NFκB erforderlich.⁽⁸⁷⁾ Zudem existiert ein MyD88 unabhängiger Signalweg aufgrund der LPS vermittelten Expression von Interferon induzierbaren Genen und der Ausreifung von DCs in MyD88 defizienten Mäusen.⁽⁸⁸⁾ Das hierfür verantwortliche und kürzlich beschriebene Adapterprotein „TIR domain containing adapter inducing IFN-β“ (TRIF) induziert nach TLR-3 und TLR-4 Aktivierung MyD88 unabhängig über den „IFN regulatory factor 3“ (IRF3) die Transkription von IFN Typ I.⁽⁸⁹⁾ Allerdings benötigt TLR-4 für die Assoziation mit TRIF zusätzlich das Adapterprotein „TRIF-related adaptor molecule“ (TRAM).⁽⁹⁰⁾ Abbildung 4 gibt einen Überblick zur TLR-Signalkaskade.

1.5. Die duale Funktion von TLR-2 bezüglich Pathogenabwehr & Manifestation der T_H1/T_H2 Antwort

1.5.1. Die TLR-2 vermittelte Abwehr von *S. aureus*

Zellwandbestandteile von *S. aureus*, wie Peptidoglycan und Lipoteichonsäure, werden klassischerweise von TLR-2 erkannt.⁽⁹¹⁾ Im Fall von Peptidoglycan sind hierfür die Leucine in den Positionen 107, 112 und 115 sowie Serin in der Position 40 und Isoleucin in der Position 64 der extrazellulären Domäne des Rezeptors verantwortlich.⁽⁹²⁾ Untersuchungen an humanen Keratinozyten zeigen eine TLR-2 abhängige Sekretion von IL-8 nach Peptidoglycan-Stimulation.⁽⁹³⁾ Durch Rekrutierung neutrophiler Granulozyten können dann die Pathogene eliminiert werden, während TLR-2 defiziente Mäuse eine intradermale Besiedlung mit *S. aureus* nach subkutaner Injektion dieses Keims aufweisen.⁽⁹⁴⁾ Eine erhöhte Suszeptibilität zur *S. aureus* Besiedlung beim Menschen wird dagegen bei Vorhandensein der heterozygoten TLR-2 R753Q Punktmutation innerhalb der TIR-Domäne postuliert.⁽⁹⁵⁾

1.5.2. Die T_H1 sowie T_H2 polarisierenden Eigenschaften von TLR-2

Die Aktivierung von TLR-2 kann zudem die adaptive Immunantwort in unterschiedlicher Weise beeinflussen. So können bakterielle Lipoproteine eine TLR-2 abhängige IL-12 Produktion in Makrophagen und damit eine T_H1-gerichtete Antwort induzieren.⁽⁹⁶⁾ Neben einer verstärkten IFN-γ Sekretion humaner T-Zellen nach Lipoprotein-Stimulation kommt es im murinen Modell auch zur Inhibition der antigen-spezifischen IgE-Synthese sowie der

Eosinophilen Rekrutierung in der Lunge.⁽⁹⁷⁾ Andererseits sind für TLR-2 auch T_H2 favorisierende Eigenschaften beschrieben. So hat die TLR-2 Stimulation mit Peptidoglycan und Lipoproteinen die Expression von p19/IL-23 in DCs zur Folge, wodurch die Entstehung von T_H2 Zellen begünstigt wird.⁽⁹⁸⁾ Außerdem mündet diese Stimulation in der selektiven Aktivierung von ERK1/2 (p42/p44) und damit der Stabilisierung des Transkriptionsfaktors c-Fos, einem IL-12 Inhibitor.⁽⁹⁹⁾ Selbst aus der Haut isolierte Mastzellen reagieren nach TLR-2 abhängiger Peptidoglycan-Stimulation mit einem für die allergische Reaktion typischen Muster, nämlich mit Degranulation und IL-4 sowie IL-5 Sekretion.⁽¹⁰⁰⁾ In-vivo führt die Immunisierung von Mäusen mit TLR-2 Liganden zu einer Exazerbation von Asthma bzw. zu einer T_H2-getriggerten Antwort.^(101,102) Zweifellos sind weitere Untersuchungen notwendig, um den differentiellen Charakter der TLR-2 Liganden hinsichtlich der T_H1 bzw. T_H2 Polarisierung endgültig zu klären.

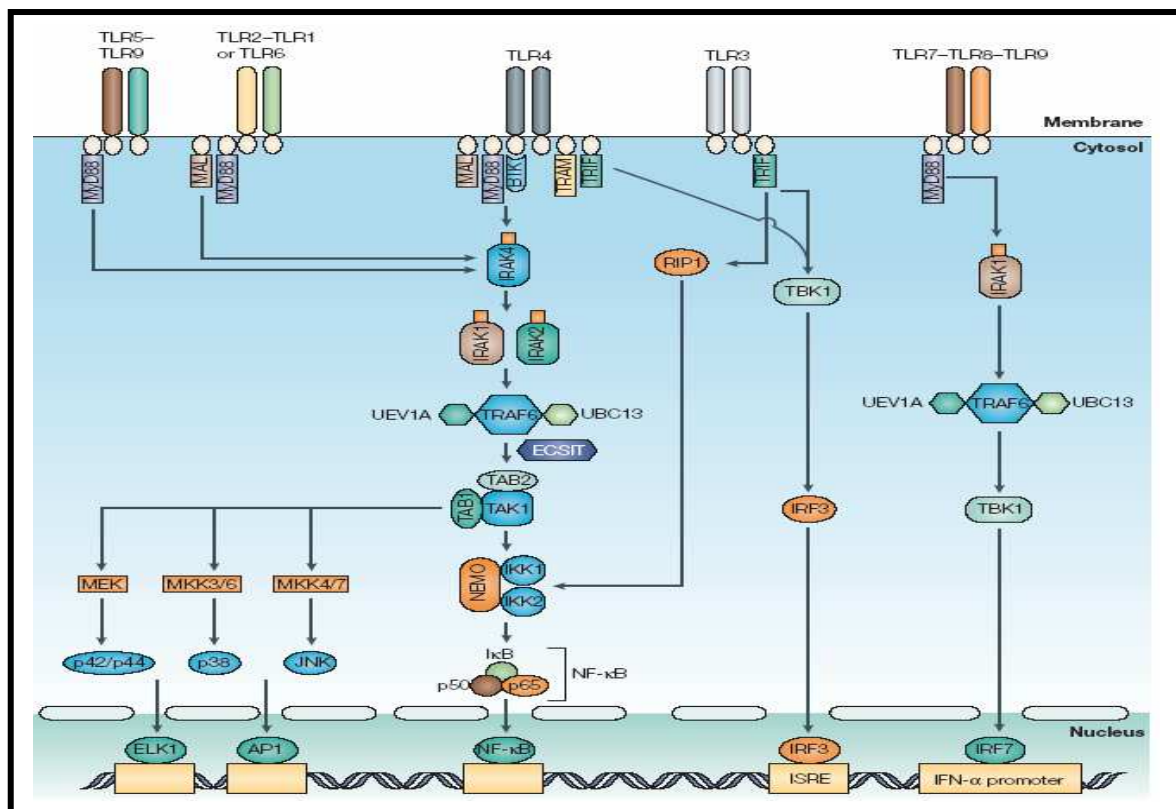


Abb.4: TLR-Signalkaskade & Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren

Nach TLR Stimulation kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Adaptoren und Kinasen, wodurch Transkriptionsfaktoren in den Zellkern translozieren und daraufhin die Expression von proinflammatorischen Zytokinen bzw. Typ I Interferonen induzieren. Nach: Dunne A und O'Neill LAJ. Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. FEBS Letters 2005; 579:3330-5; Ref.⁸⁴

1.6. Problemstellung, Hypothesen und Zielsetzung der Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Problematik der rezidivierenden *S. aureus* Besiedlung in der atopischen Dermatitis. Bis heute ist unklar, inwiefern Störungen des adaptiven Immunsystems zur erhöhten Suszeptibilität gegenüber diesen Keimen beitragen. Es ist im allgemeinen bekannt, dass das Fehlen oder die eingeschränkte Produktion bestimmter IgG-Subklassen bakterielle Infektionen begünstigen. Im Hinblick auf die atopische Dermatitis lässt sich so folgende Hypothese ableiten:

HYPOTHESE I:

Die *S. aureus* Besiedlung in der atopischen Dermatitis resultiert aus einer IgG-Subklassendefizienz bzw. aus einer stark verminderten Synthese bestimmter IgG-Subklassen

- ▶ Zur Untersuchung dieses Aspektes soll das IgG1 bis IgG4 Subklassenprofil im Serum erwachsener AD Patienten erstellt und im Zusammenhang der *S. aureus* Besiedlung charakterisiert werden.

Weiterhin bedarf es einem grundlegenden Verständnis der *S. aureus* spezifischen adaptiven Immunantwort, um die mangelnde Protektion gegenüber den Superantigen-vermittelten Effektormechanismen zu erklären.

HYPOTHESE II:

Die mangelnde Protektion gegenüber Superantigenen in der atopischen Dermatitis beruht auf einer geringeren Synthese Superantigen-spezifischer IgG-Subklassen

- ▶ Charakterisierung des IgG-Subklassenprofils mit Spezifität der bei den Patienten meist identifizierten Superantigene und Vergleich zum Kontrollkollektiv

HYPOTHESE III:

Die mangelnde Protektion gegenüber Superantigenen in der atopischen Dermatitis beruht auf einer funktionell eingeschränkten Kapazität Superantigen-spezifischer IgG Antikörper

- ▶ Um die Funktionalität Superantigen-spezifischer IgG Antikörper zu untersuchen, soll der Grad ihrer neutralisierenden Wirkung gegenüber dem jeweiligen Toxin im nicht-

atopischen in-vitro Zellsystem ermittelt und mit dem der hautgesunden Probanden verglichen werden.

Neben einer möglichen fehlgesteuerten adaptiven Immunantwort könnten auch Störungen innerhalb angeborener Abwehrmechanismen für die Suszeptibilität zu *S. aureus* verantwortlich sein. Eine Möglichkeit wäre die unvollständige Pathogenerkennung und Abwehr durch TLR-2 infolge einer genetischen Mutation.

HYPOTHESE IV:

Patienten mit atopischer Dermatitis neigen häufig zu der TLR-2 R753Q Punktmutation

- Genotypisierung der Patienten hinsichtlich der TLR-2 R753Q Punktmutation und Vergleich zu den hautgesunden Probanden

HYPOTHESE V:

Die TLR-2 R753Q Punktmutation begünstigt die *S. aureus* Besiedlung

- Neben einer Zusammenhanganalyse zwischen dem Auftreten der Mutation und der Erkrankung soll auch die funktionelle Bedeutung dieser Mutation in-vitro untersucht werden.

Ebenso herrscht Unklarheit darüber, inwiefern andere staphylogene Komponenten wie die Zellwandbestandteile Peptidoglycan und Lipoteichonsäure in der Pathogenese der atopischen Dermatitis involviert sind. Aufgrund der massiven Infiltration von CD4⁺ T-Zellen in der Haut wäre eine direkte Interaktion zwischen diesen bakteriellen Komponenten und den T-Zellen denkbar.

HYPOTHESE VI:

CD4⁺ T-Zellen exprimieren TLR-2

- Die TLR-2 Expression soll in aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen nicht-atopischer Spender durchflusszytometrisch sowie auf mRNA Ebene nachgewiesen werden.

HYPOTHESE VII:

Staphylogene Komponenten können die Effektorfunktion von CD4⁺ T-Zellen direkt über TLR-2 beeinflussen

- Das T_H1/T_H2 Zytokinprofil soll nach Stimulation von aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen nicht-atopischer Spender mit staphylogenen TLR-2 Liganden ermittelt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Patienten & Datenerhebung

Um die eingangs postulierten Zusammenhänge erörtern zu können, war eine vorherige Charakterisierung des Patientenkollektivs hinsichtlich Schweregrad des Ekzems, bakterielle Besiedlung und Sensibilisierungsgrad notwendig, da sich einige Experimente auf Patientendaten nach ausgewählten Kriterien stützten.

2.1.1. Studienkollektiv: Alter & Schweregrad des Ekzems

Im Rahmen einer Querschnittsstudie wurden insgesamt 89 Patienten mit atopischer Dermatitis in der Abteilung für Dermatologie und Allergologie der Medizinischen Hochschule Hannover nach Einwilligung der örtlichen Ethikkommission und der schriftlichen Einverständniserklärung der Patienten rekrutiert. Ihr Alter bewegte sich im Bereich von 14 und 78 Jahren mit einem Medianalter von 31 Jahren. Nach positiver Diagnosestellung gemäß den Kriterien von Hanifin und Rajka wurde der Schweregrad der Erkrankung mittels dem SCORAD Index bestimmt. Hierbei handelte es sich um ein von der Europäischen Arbeitsgemeinschaft „Atopisches Ekzem“ entwickeltes Bewertungssystem, welches anhand von Flächenausdehnung, morphologischen Hautveränderungen und subjektiven Symptomen (Juckreiz, Schlafverlust) die Errechnung eines Gesamtscores zuließ.⁽¹⁰³⁾ Nach internationaler Übereinstimmung definierte ein SCORADscore von 1 bis 25 Punkten eine leichte Dermatitis, während ein SCORADscore von 50 bis maximal 104 Punkten für eine schwere Dermatitis stand.⁽¹⁰⁴⁾ Weiterhin erhielten die Patienten mindestens vier Wochen vor der Rekrutierung weder steroidhaltige noch antibiotische Präparate, um sowohl den Entzündungsprozess als auch den darauf wirkenden Einfluss von *S. aureus* sowie die Inzidenz und das Profil der bakteriellen Besiedlung im nicht manipulierten Zustand zu erfassen. Ferner zeigten die Patienten keine Anzeichen einer bakteriellen Superinfektion, die ohnehin nicht mit dem normalen Ablauf der Pathogenese zusammenhing. Als Kontrollen dienten 28 altersgleiche, hautgesunde Probanden aus der eigenen Abteilung.

2.1.2. Anzucht & Nachweis von *S. aureus* aus Hautabstrichen

MATERIAL:

Reagenzien	Beschreibung	Firma
BBL Port-A-Cul Röhrchen	Transport von Mikroorganismen unter anaeroben und reduzierenden Bedingungen	BD

Mittels steriler Watteträger wurden den Patienten Hautabstriche im Bereich ekzematöser Läsionen entnommen und daraufhin nach Marburg verschickt. Analog dazu erfolgte die Probenentnahme bei den hautgesunden Probanden an der Vorderseite des Unterarms. Der aktuelle Status der *S. aureus* Besiedlung wurde durch Beimpfen zweier verschiedener Nährplatten mit dem Probenmaterial in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Klotz im Institut für Medizinische Mikrobiologie Marburg unter Leitung von Prof. Heeg bestimmt. Während die Blutagarplatten (mit 5% Schafsblut versetzt) eine eher unselektive Methode darstellten, erlaubte die Anwendung der 7.5% NaCl-haltigen Mannitplatten einen präzisen Nachweis dieser Bakterien, die als gelbliche Kolonien erschienen. Vor ihrer Identifizierung nach standardisierten mikrobiologischen Methoden ging eine 24-stündige Inkubation bei 35 °C voraus.

2.1.3. Nachweis der von *S. aureus* sezernierten Enterotoxine

MATERIAL:

Reagenzien	Beschreibung	Firma
SET-RPLA	Detektionskit für Staphylokokken Enterotoxine	Oxoid

Für den in-vitro Toxinnachweis wurde ein Inokulum des isolierten *S. aureus* in Flüssignährmedium (Trypton-Soja Bouillon) überführt und für 18 bis 24 Stunden bei 37 °C unter Schwenken inkubiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 900 x g wurde der hieraus gewonnene Kulturüberstand unverdünnt für den Latexagglutinationstest eingesetzt und entsprechend den Angaben des Herstellers auf die Präsenz der Enterotoxine SEA, SEB, SEC, SED und TSST-1 überprüft. Das Prinzip dieses Testsystems beruhte auf der Agglutination nach Zugabe der gegen die jeweiligen Toxine gerichteten Antikörper. Auch diese Untersuchungen wurden von Frau Dr. Klotz durchgeführt.

2.1.4. Bestimmung von Gesamt-IgE & spezifischen IgE Antikörpern im Serum

MATERIAL:

Reagenzien	Beschreibung	Firma
UniCAP	SEA-SED und TSST-1	Pharmacia Diagnostic
Klinikbedarf	Beschreibung	Firma
Serumröhrchen	10 ml	Sarstedt
Venenpunktionsbesteck	pyrogenfrei	HMD
Multi Adapter	pyrogenfrei	Sarstedt
Geräte	Beschreibung	Firma
Zentrifuge Pharmacia CAP System	Megafuge 1.0R; Rotor: # 2704	Heraeus Pharmacia und Upjohn

Die Patienten wurden hinsichtlich ihres Sensibilisierungsgrades gegenüber den Staphylokokken-Enterotoxinen SEA-SED und TSST-1 sowie gegen das Hausstaubmilben Allergen *Dermatophagoides pteronyssinus* (in Hannover) untersucht. Neben der spezifischen IgE Antikörperbestimmung war außerdem das Gesamt-IgE von Interesse. Zur Analyse der genannten Parameter wurden Patientenserum benötigt, die zwei Stunden nach Blutabnahme (Venenpunktion) in Abwesenheit von Gerinnungshemmstoffen und anschließender 15-minütiger Zentrifugation bei 3500 x g und 4°C als Überstände vorlagen. À 250 µl aliquotiert wurden die Seren für weitere Verwendungszwecke bei -20°C gelagert. Die Messung erfolgte schließlich mittels des Pharmacia CAP Systems (Fluoreszenz-Enzym-Immuno-Assay) nach Angaben des Herstellers im Allergielabor der Abteilung. Die Ergebnisse wurden in kU/l angegeben, wobei 1 kU/l einer Konzentration von 2.4 ng/ml entsprach. Das Detektionslimit dieses Testsystems lag bei einem Wert von 0.35 kU/l.

2.2. Charakterisierung der adaptiven Immunantwort in der AD

2.2.1. Nephelometrische Bestimmung der IgG-Subklassen

Die quantitative, serologische Bestimmung der IgG-Subklassen IgG1 bis IgG4 unter Anwendung eines kommerziellen Kits der Firma Binding Site erfolgte auf dem Behring BNII Nephelometer im Routinelabor der Abteilung nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip der Nephelometrie beruhte auf der Messung von Streulicht, welches durch Bildung eines unlöslichen Antigen-Antikörper Komplexes in einer Lösung erzeugt wurde und im

Überschuss des Antikörpers direkt proportional zur Antigenkonzentration war. Im Fall von IgG3 und IgG4 Antiserum musste eine vorherige Kopplung an Latexpartikeln stattfinden, um den Immunkomplex hinreichend zu vergrößern und dadurch der nephelometrischen Bestimmung zugänglich zu machen. Zur Ermittlung der Konzentration von IgG1, IgG3 und IgG4 Antikörpern wurden die Seren 1:5 bis 1:100 verdünnt, sowie 1:5 bis 1:20 für die quantitative Bestimmung der IgG2 Subklasse. Die aus der Kalibrationskurve des Standards errechneten Konzentrationen wurden in µg/ml angegeben.

2.2.2. Bestimmung von anti-SEB/SEC1 IgG1, IgG2 & IgG4 mittels ELISA

MATERIAL:

Reagenzien/Antikörper	Beschreibung	Firma
SEB	partiell aufgereinigt	Sigma-Aldrich
SEC1	partiell aufgereinigt	Toxin Technology
NaHCO ₃		Merck
PBS-DULBECCO	Pulver; Ø Ca ²⁺ /Mg ²⁺ ; 9.55 g/l H ₂ O pH:7.4	Biochrom
PBS-DULBECCO	Fertiglösung; Ø Ca ²⁺ /Mg ²⁺	PAA
Tween		Merck
Gelatine	aus Fischhaut	Sigma
BM Blue POD	3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Roche Diagnostics
H ₂ SO ₄		Merck
α-SEB IgG	aus Schaf; affinitätsgereinigt	Toxin Technology
α-SEC1 IgG	aus Schaf; affinitätsgereinigt	Toxin Technology
α-human IgG1-HRPO	Clone:HP6070; murin IgG1κ; Epitop: F _c	Caltag
α-human IgG2-HRPO	Clone:HP6014; murin IgG1κ; Epitop: F _d	Caltag
α-human IgG4-HRPO	Clone:HP6025; murin IgG1κ; Epitop: F _c	ICN
α-sheep IgG-HRPO	aus Kaninchen; affinitätsgereinigt	DAKO
Verbrauchsmaterial	Beschreibung	Firma
15 ml Probenröhrchen	steril	Sarstedt
ELISA Tubes	1.3 ml	greiner bio-one
Tube Holder		Micronic Systems
96-Well Platte	Polystyren; Immuno Maxisorp	Nunc
Klebefolie		Greiner
Geräte	Beschreibung	Firma
Waage		Sartorius
Millipore-Q-Filtrationsanlage		Millipore
Nunc-Immuno™ Wash 12	Absaugvorrichtung mit 12 Kanälen	Nunc Brand Products
ELISA Reader	für 96 und 384-Well Plattenformat	Tecan Sunrise

Durch Etablierung eines geeigneten ELISA Systems war die quantitative Bestimmung Superantigen-spezifischer IgG-Subklassen möglich. Hierfür wurden SEB bzw. SEC1 zu einer Konzentration von 2 µg/ml in NaHCO₃-Puffer pH 9.5 angesetzt und anschließend Mikrotiterplatten im 96-Well Format mit je 50 µl dieser Lösung beschichtet. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Platten 5-mal mit PBS/0.1% Tween

gewaschen und unspezifische Proteinbindungsstellen durch Zugabe von je 50 µl PBS/0.1% Tween/1% Gelatine (Blockierungslösung) für 2 Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend wurden die Platten wie zuvor gewaschen, dann je 50 µl der Patienten bzw. Kontrollseren (s. Abschnitt 2.1.4.) zu unterschiedlichen Verdünnungsstufen (in Blockierungslösung) aufgetragen und für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Konzentration SEB/SEC1 spezifischer IgG1 und IgG4 Subklassen ermitteln zu können, waren insgesamt 15 Verdünnungsstufen erforderlich, die nachfolgend aufgelistet sind: 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:25; 1:50; 1:100; 1:250; 1:500; 1:750; 1:10³; 1:1500; 1:2000; 1:2500 und 1:5000. Die letzten fünf Verdünnungsstufen entfielen für die Bestimmung der SEB/SEC1 spezifischen IgG2 Subklasse. Nach erneutem Waschen folgte die Zugabe von je 50 µl der entsprechenden und unterschiedlich in Blockierungslösung verdünnten Peroxidase (HRPO)-konjugierten Sekundärantikörper. So lag die Verdünnung zur optimalen Detektion von IgG1 bei 1:500, von IgG4 bei 1:250 und von IgG2 bei 1:100. Nach einer weiteren 45-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und dem letzten Waschschrift konnte schließlich durch Zugabe von je 100 µl vorgewärmten BM Blue POD Substrat unter blauer Farbentwicklung die durch die Peroxidase vermittelte Enzymreaktion und damit indirekt die gebundenen SEB/SEC1 spezifischen IgG Antikörper sichtbar gemacht werden. Dabei war nach Lambert-Beer die Intensität des blauen Reaktionsproduktes direkt proportional zur Antikörperkonzentration der Probe. Die Zugabe von 100 µl 2M H₂SO₄ pro Kavität beendete die Enzymreaktion durch einen gelben Farbumschlag und erlaubte nun die Absorptionsmessung bei $\lambda=450$ nm gegen eine Referenzwellenlänge von $\lambda=650$ nm mit der entsprechenden Photometersoftware Magellan Version 3.11. Als Standard dienten kommerziell erhältliche anti-SEB/SEC1 IgG Antikörper aus Schaf mit einer bekannten Ausgangskonzentration von 1000 µg/ml, die durch einen 1:6000 in Blockierungslösung verdünnten anti-sheep IgG Peroxidase Antikörper detektiert wurden. Die Standardreihe selbst deckte einen Konzentrationsbereich von 100 ng/ml bis 3.125 ng/ml ab, wobei in 1:2 Verdünnungsschritten ausgehend von der höchsten Konzentration bis zum Erreichen der niedrigsten Konzentration vorgegangen wurde. Die anhand der Standardkurve errechneten Antikörperkonzentrationen wurden in der Einheit Laborunit (LU)/ml angegeben.

2.2.3. Bestimmung von PCP-spezifischen IgG2 Antikörpern mittels ELISA

Die 23 häufigsten Pneumokokken-Kapsel-Polysaccharid Antigene (PCP) induzieren eine klassische IgG2 Synthese und machen etwa 80% der allgemein auftretenden, virulenten

Serotypen aus. Patienten mit rezidivierenden Pneumokokken-Infektionen können so auf Störungen dieser spezifischen Immunantwort hindeuten. Die serologische Bestimmung von anti-PCP IgG2 Antikörpern mit Hilfe eines kommerziellen ELISA Kits der Firma Binding Site diente in diesem Fall als Kontrolle zur unbeeinträchtigten IgG2 Synthese gegenüber PCP-Antigenen bei Patienten mit atopischer Dermatitis. Nachdem alle Kitkomponenten Raumtemperatur erreicht hatten, wurden die Patienten- und Kontrollseren 1:100 mit dem beigefügten C-Polysaccharid (CPS) haltigem Puffer (10 µl Probe + 1000 µl Puffer) verdünnt, wodurch der Anteil CPS-spezifischer IgG2 Antikörper abgefangen wurde. Infolge einer Pneumokokken-Infektion kamen diese zu 30% ebenfalls vor, spielten jedoch bei der Abwehr der Erreger nur eine untergeordnete Rolle. Die bereits mit dem PCP-Antigen beschichtete 96-Well Platte wurde mit je 100 µl der fünf anti-PCP IgG2 Kalibratoren, den Positiv- und Negativkontrollen sowie den verdünnten Proben belegt und für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Bindung der anti-PCP IgG2 Antikörper an das immobilisierte Antigen wurde die Platte 3-mal mit dem entsprechenden Puffer gewaschen und daraufhin mit 100 µl anti-human IgG2 Peroxidase Konjugat je Kavität versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation und darauffolgendem Waschen wurde das gebundene Konjugat durch Zugabe von je 100 µl TMB-Substrat detektiert, wobei die im Dunkeln ablaufende Enzymreaktion durch Zugabe von je 100 µl 3M Phosphorsäure beendet wurde. Die Messung des gelben Reaktionsproduktes erfolgte bei $\lambda=450$ nm, und der Messbereich lag zwischen 1.1 bis 90 µg/ml.

2.2.4. Isolierung von PBMCs aus Patienten mit/ohne anti-SEC1 IgG2 Defizienz & Restimulation mit staphylogenen Komponenten

Tab.3: Phänotypische Charakterisierung der zur Blutabnahme rekrutierten AD Patienten

PATIENT	anti-SEC1 IgG2	anti-SEC1 IgE	Gesamt IgE	<i>S. aureus</i>	SCORAD
# 20	1.859 LU/ml	< 0.35 kU/l	162 kU/l	ja; SEC1	24.3
# 79	1.373 LU/ml	0,40 kU/l	7.172 kU/l	ja; SAg ^{neg}	34.4
#77	1.376 LU/ml	0,50 kU/l	5.160 kU/l	nein	34.1
#56	2.126 LU/ml	6.00 kU/l	16.014 kU/l	ja; SEC1	40.7
# 40	0	< 0.35 kU/l	1.614 kU/l	ja; SEB	75.5
# 63	0	6.20 kU/l	19.596 kU/l	ja; SEC1	87.5
#51	0	2.10 kU/l	7.293 kU/l	ja; SAg ^{neg}	55.8
#71	0	4.60 kU/l	43.838 kU/l	ja; SAg ^{neg}	62.8

MATERIAL:

Reagenzien	Beschreibung	Firma
ISCOVE- Basismedium	ohne L-Glutamin	Biochrom KG
AB-Serum	hitzeinaktiviert	Blutbank der MHH
L-Glutamin		Biochrom KG
Gentamycin		Biochrom KG
Penicillin/Streptomycin		Biochrom KG
nichtessentielle Aminosäuren	100 x konzentriert; enthält: Alanin; Asparaginsäure; Glutaminsäure, Glycin; Prolin; Serin	Biochrom KG
Ficoll Hypache	d=1.077 g/ml	Nycomed Pharma AS
SEB	hochaufgereinigt	Toxin Technology
SEC1	hochaufgereinigt	Toxin Technology
Lipoteichonsäure		Sigma Aldrich
Peptidoglycan		Sigma Aldrich
Limunus Assay		Biowhittaker
Verbrauchsmaterial	Beschreibung	Firma
50 ml Probenröhrchen	steril	Greiner
Neubauer-Zählkammer	Tiefe:0.1 mm; 0.0025 mm ²	Roth
Deckglas	22 x 22 x 0.4 mm	Knittel
96-Well Platte mit Deckel	Rundboden; steril	Nunc
Geräte	Beschreibung	Firma
Mikroskop	Phasenkontrast	Zeiss
Rotina 46R Zentrifuge	Rotor:184 mm	Hettich
Brutschrank		Heraeus Instruments

Zur Gewinnung mononukleärer Zellen (Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen) des peripheren Blutes, auch PBMCs genannt, wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation unter Anwendung von Ficoll-Hypaque durchgeführt, einem Trennmedium bestehend aus hochpolymerer Methylcellulose (Ficoll) und Metrizoat (Na-Diatrizoat, ein Röntgenkontrastmittel; amerikanisch Hypaque). Heparinisiertes, venöses Blut der in Tabelle 3 beschriebenen Patienten wurde zunächst 1:2 mit ISCOVE-Basismedium verdünnt und im gleichen Volumenteil wie des bereits vorgelegten Trennmediums überschichtet. Es folgte eine 40-minütige Zentrifugation bei 400 x g sowie bei niedrigster Beschleunigung und ausgeschalteter Bremsfunktion. Während der Zentrifugation agglutinierten Erythrozyten und Granulozyten mit dem Ficoll und erlangten durch das Metrizoat zusätzlich eine höhere Dichte, wodurch sie schneller sedimentierten. Die PBMCs hingegen verblieben aufgrund niedrigerer Dichte zum Ficoll an der Grenze zwischen dem Trennmedium und der oberen Plasmaphase und setzten sich aus ~5% B-Zellen, ~5-15% Monozyten, ~60-70% T-Zellen und ~5-15% NK-Zellen zusammen. Die Interphase wurde nun vorsichtig entnommen, hiernach mit ISCOVE-Basismedium auf 10 ml ergänzt und anschließend für 15 Minuten bei 400 x g zentrifugiert, um restliches, auf Dauer toxisch wirkendes Trennmedium herauszuwaschen. Zur Entfernung der im

Sediment noch enthaltenen Blutplättchen schlossen sich zwei weitere Waschgänge mit ISCOVE-Basismedium durch jeweils 15-minütige Zentrifugation bei 150 x g an. Das Zellpellet wurde schließlich in 10 ml ISCOVE-Basismedium resuspendiert, welches mit humanen AB Serum [4%], Glutamin [2 mM], Gentamycin [50 µg/ml], Penicillin [100 µg/ml], Streptomycin [100 µg/ml] und nichtessentiellen Aminosäuren [1%] supplementiert war. Die Zellen wurden nach lichtmikroskopischer Auszählung mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer auf 3×10^5 pro 200 µl eingestellt und in eine 96-Well Rundbodenplatte verteilt. Anschließend folgte eine Stimulation mit SEB und SEC1 [100 pg/ml] sowie Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglycan [1 µg/ml] für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Zuvor jedoch wurden alle Antigenpräparationen hinsichtlich einer LPS Kontamination mittels dem Limulus Assay entsprechend den Herstellerangaben überprüft, wobei keine signifikanten LPS Mengen nachweisbar waren. Die Patientenrekrutierung, Blutabnahme und Generierung der PBMCs mit anschließender Stimulation wurden in der Abteilung für Dermatologie und Allergologie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

2.2.5. Analyse des Zytokinprofils nach dem Cytometric Bead Array System

MATERIAL:

Reagenzien	Beschreibung	Firma
T _H 1/T _H 2 CBA Kit		BD Biosciences Pharmingen
Verbrauchsmaterial		Firma
FACS-Röhrchen	5 ml Polystyrene Rundboden-Gefäß	BD Falcon
Geräte		Firma
Schüttler		GFL
FACScan		Beckton Dickonson

Zur quantitativen Zytokinbestimmung der aus 2.2.4. generierten Kulturüberstände wurde der kommerziell erhältliche T_H1/T_H2 Cytometric Bead Array (CBA) Kit verwendet, womit in einem Ansatz die Zytokine IL-2; IL-4; IL-5; IL-10; TNF-α und IFN-γ simultan erfasst wurden. Das Prinzip der Messung beruhte auf dem Vorhandensein von sechs verschiedenen Latexpartikelarten, an denen die jeweiligen Zytokin-spezifischen Primärantikörper gekoppelt waren. Bei Anregung mit einem Laser (488 nm) zeigten sie unterschiedliche Eigenfluoreszenzen und ermöglichten somit die Differenzierung zwischen den einzelnen Zytokinpopulationen. Zum Versuchsablauf selbst: Zunächst wurde der lyophilisierte

Zytokinstandard in 200 µl Assay Diluent für mindestens 30 Minuten rekonstituiert und so für jedes vorhandene Zytokin auf eine Konzentration von 50 ng/ml gebracht. Anschließend wurden 100 µl der Stocklösung zu 900 µl Assay Diluent pipettiert, um den 1. Standard mit einer Konzentration von 5000 pg/ml zu generieren. Hiervon ausgehend wurde nun in 1:2 Verdünnungsschritten die Standardreihe erstellt, wobei acht weitere Röhrchen mit bereits 300 µl vorgelegtem Assay Diluent einbezogen wurden. Der letzte Standard hatte eine Konzentration von 20 pg/ml. Jeweils 50 µl des vorbereiteten Standards sowie je nach Stimulationsart vorverdünnten Probe (für SEC1 und Peptidoglycan 1:5, sonst unverdünnt) wurden nun mit je 50 µl des Zytokindetektionsgemischs und 50 µl des Phycoerythrin (PE)-konjugierten Sekundärantikörpers versetzt, welcher gegen die jeweiligen Zytokine gerichtet war und dessen Fluoreszenzintensität als Maß für die Proteinkonzentration galt. Es folgte eine dreistündige Inkubation im Dunkeln und bei Raumtemperatur, um den gewünschten Sandwich-Komplex bestehend aus dem am Partikel gekoppelten Primärantikörper, dem Zytokin in der Probe sowie dem PE- konjugierten Sekundärantikörper bilden zu können. Nach Zugabe von 1 ml Waschpuffer wurden die Röhrchen bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert und schließlich in 300 µl Waschpuffer aufgenommen. Die Messung und Auswertung erfolgten am FACScan Durchflusszytometer mit Hilfe der entsprechenden CBA Software Version 1.4 gemäß den Herstellerangaben.

2.2.6. Protein A-Affinitätschromatographie zur Gewinnung einer IgG-Fraktion

Tab.4: Phänotypische Charakterisierung der Patienten mit möglicherweise unzureichender SEB Protektion. Als besonderes Indiz hierfür galt das anti-SEB IgE.

PATIENT	anti-SEB IgE	<i>S. aureus</i>	Gesamt IgE	SCORAD
# 56	14.00 kU/l	ja; SEC1	16.014 kU/l	40.7
# 71	16.30 kU/l	ja; SAg ^{neg}	43.838 kU/l	62.8
# 84	10.40 kU/l	ja; SAg ^{neg}	2.387 kU/l	52.5
# 89I	0.90 kU/l	ja; SEB	6.372 kU/l	52.7

Tab.5: Phänotypische Charakterisierung der Patienten mit möglicherweise unzureichender SEC1 Protektion. Als besonderes Indiz hierfür galt das anti-SEC1 IgE.

PATIENT	anti-SEC1 IgE	<i>S. aureus</i>	Gesamt IgE	SCORAD
# 54	2.60 kU/l	ja; SAg ^{neg}	25.806 kU/l	74.9
# 60	7.60 kU/l	nein	28.614 kU/l	25.3
# 63	6.20 kU/l	ja; SEC1	19.596 kU/l	87.5
# 70	1.90 kU/l	ja; SEA	12.564 kU/l	62.3
# 99	3.60 kU/l	ja; SEC1	26.554 kU/l	65.5

MATERIAL:

Reagenzien	Beschreibung	Firma
Protein A Antibody Purification Kit		Sigma
Verbrauchsmaterial		Firma
Sterilfilter	Ø 0.45 µm	Kobe
Einmalspritzen	5.0 ml; steril	Braun
Reaktionsgefäße	1.5 ml; autoklaviert	Eppendorf

Eine Möglichkeit die Funktionalität Superantigen-spezifischer IgG Antikörper in-vitro zu testen, bestand in der Charakterisierung ihres Inhibitionsgrades hinsichtlich einer Superantigen-vermittelten T-Zellantwort im Vergleich zu Antikörpern hautgesunder Probanden. Für diesen Zweck war eine gereinigte IgG-Fraktion ausgewählter Patientenserum erforderlich, die wie in Tabelle 4 und Tabelle 5 dargestellt, Anzeichen einer mangelnden Protektion gegenüber das jeweilige Superantigen zeigten. Anhand der entsprechenden Sensibilisierung, der Höhe des Gesamt-IgE sowie dem Schweregrad des Ekzems konnten, wenn auch nicht immer eindeutig, indirekte Rückschlüsse auf das Wirken des jeweiligen Superantigens postuliert werden. Die Isolierung der IgG Antikörper aus dem Serum der Patienten sowie der fünf hautgesunden Probanden erfolgte nach dem Prinzip der Protein A-Affinitätschromatographie mittels eines kommerziellen Produktes, basierend auf der Eigenschaft der IgG Antikörper mit ihrem F_c-Teil spezifisch an Protein A, einem von *S. aureus* exprimierten Oberflächenprotein, zu binden. Aufgrund der maximalen Bindungskapazität der Protein A-Säule wurden pro Lauf 2 ml eines Probandenserums eingesetzt, vorher jedoch sterilfiltriert, um eine Verstopfung der Säulenmatrix zu verhindern. Anschließend wurde das Serum auf 6 ml mit Binding-Puffer ergänzt und so auf den für die Bindung erforderlichen pH-Wert angepasst. Die Protein A-Säule selbst wurde zunächst mit 5 ml Regenerations-Puffer und einer Durchflussrate von 1 ml pro Minute vorbereitet und hiernach mit 4 ml Binding-Puffer und der gleichen Durchflussrate equilibriert. Es folgte das Auftragen des Probengemisches mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.5 ml pro Minute und somit entsprechend den Herstellerangaben die Immobilisierung von 20 bis 30 mg humanen IgG. Hiernach schloss sich ein Waschschrift der Säule mit 6 ml Binding-Puffer und einer Durchflussrate von 1 ml pro Minute an. Die zweite, sogenannte Entsalzungs-Säule wurde vorher durch Zugabe von 10 ml HEPES-Puffer (Flussgeschwindigkeit: 1 ml pro Minute) vorbereitet und dann mit der Protein A-Säule verschraubt. Durch Auftragen von 5 ml Elutions-Puffer auf die Protein A-Säule mit einer Durchflussrate von 0.5 ml pro Minute erhielt man schließlich

eine aufgereinigte IgG-Fraktion im physiologischem pH-Wert, die nach Sterilfiltration à 250 µl portioniert und bei -20 °C gelagert wurde.

2.2.7. Analyse der IgG-Fraktion im ^3H Thymidin Proliferationstest

PATIENT	anti-SEB IgG
# 56	1.732 LU/ml
# 71	38.993 LU/ml
# 84	13.515 LU/ml
# 89I	87.300 LU/ml

Tab.6: Konzentration SEB spezifischer IgG Antikörper nach Aufreinigung der Patientenseren aus Tab.5.

Gemäß Abschnitt 2.2.2. konnte durch Anwendung eines 1:2000 verdünnten α -human IgG-HRPO Antikörpers (Sigma) auch die Konzentration der Gesamt-SEB spezifischen IgG Antikörper ermittelt werden.

PATIENT	anti-SEC1 IgG
# 54	579 LU/ml
# 60	1.452 LU/ml
# 63	2.072 LU/ml
# 70	1.134 LU/ml
# 99	1.139 LU/ml

Tab.7:

Konzentration SEC1 spezifischer IgG Antikörper nach Aufreinigung der Patientenseren aus Tab.6.

PATIENT	anti-SEB IgG	anti-SEC1 IgG
# D	1.470 LU/ml	970 LU/ml
# L	2.546 LU/ml	1.550 LU/ml
# M	3.030 LU/ml	746 LU/ml
# V	558 LU/ml	339 LU/ml

Tab.8:

Konzentration SEB/SEC1 spezifischer IgG Antikörper nach Aufreinigung der Kontrollseren

MATERIAL:

Reagenzien	Beschreibung	Firma
Histopaque-1077		Sigma
RPMI-Medium		PAA
FCS	Fötales Kälberserum für 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert	PAA
L-Glutamin		PAA
Penicillin/Streptomycin	Penicillin G [10.000 U/ml] und Streptomycin [10 mg/ml]	PAA
SEB	hochaufgereinigt	Toxin Technology
SEC1	hochaufgereinigt	Toxin Technology
[methyl- ^3H] Thymidin		Amersham Biosciences
Szintillationsflüssigkeit		Beckmann Instruments
Kliniksbedarf	Beschreibung	Firma
Lithium-Heparin Monovette	7.5 ml	Sarstedt

Verbrauchsmaterial	Beschreibung	Firma
Einmal-Transferpipetten	3.5 ml; steril	Sarstedt
Neubauer-Zählkammer	Tiefe: 0.1 mm; 0.0025 mm ²	Kobe
Deckglas	22 x 26 mm	Kobe
96-Well Platte mit Deckel	Rundboden; steril	greiner bio-one
Glasfilter		Zinsser Analytic
Meßröhrchen	10 Stück in jedem Ständer	Beckmann
Geräte	Beschreibung	Firma
sterile Werkbank	HERA safe	Heraeus
Umkehrmikroskop		Olympus
Brutschrank	automatische Desinfektionsfunktion; für Kultivierung von Primärzellen	Heraeus
Zellerntegerät		Zinsser Analytic
β-Counter		LKB Wallac

Die aus Abschnitt 2.2.6. gewonnenen IgG-Fractionen wurden zusammen mit dem jeweiligen Superantigen für die Stimulation von PBMCs eingesetzt und hiernach der Grad der inhibierten T-Zellproliferation über ³[H] Thymidin Einbau erfasst. Zunächst wurden ca. 50 ml heparinisiertes, venöses Blut eines hautgesunden Spenders 1:2 in RPMI-Medium verdünnt, welches Glutamin [2 mM], Streptomycin [100 µg/ml], Penicillin [100 U/ml] und FCS [5%] enthielt. Anschließend wurden 20 ml des verdünnten Blutes vorsichtig auf den gleichen Volumenteil an 4 °C kaltem Histopaque-1077 überschichtet und für 30 Minuten bei 500 x g und Raumtemperatur (niedrigste Beschleunigungsstufe und ausgeschaltete Bremsfunktion) zentrifugiert. Hiernach wurde die Interphase entnommen und auf 40 ml RPMI-Medium mit den oben genannten Zusätzen aufgefüllt. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 500 x g mit eingeschalteter Bremsfunktion. Nach Resuspension und Vereinigen der einzelnen Pellets in 40 ml Endvolumen schloss sich der letzte 10-minütige Waschschritt bei 250 x g an. Schließlich wurden die Zellen in 2 ml 10% FCS-haltigem Medium aufgenommen, 1:50 verdünnt und für die lichtmikroskopische Auszählung der Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer eingesetzt. Der Durchschnittswert aus vier Großquadraten multipliziert mit dem Kammerfaktor 10⁴ sowie mit dem Verdünnungsfaktor ergab die Zellzahl pro ml. Daraufhin wurde die Zellsuspension auf 2.5 x 10⁵ PBMCs pro 200 µl Volumen eingestellt, in eine 96-Wellplatte im Rundbodenformat ausgesät und zur Normalisierung der Zellaktivität für 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Aus Vorversuchen hat sich für SEB/SEC1 eine für die T-Zellinduktion erforderliche Mindestkonzentration von 10 pg/ml ergeben. Bezüglich der Inhibitionsexperimente wurden zunächst unterschiedliche Mengen der IgG-Fraktion mit dem entsprechenden Superantigen für 90 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ vorinkubiert, um die Bildung des Antigen-Antikörper Komplexes gewährleisten zu können. Dabei enthielten die

eingesetzten Volumina an aufgereinigtem IgG gemäß Tabelle 6 und Tabelle 8 SEB spezifische IgG Antikörper in den Konzentrationen [0,25 LU/ml]; [1,25 LU/ml]; [5 LU/ml]; [25 LU/ml] und [250 LU/ml]. Im Gegensatz dazu waren nach Tabelle 7 und Tabelle 8 SEC1 spezifische IgG Antikörper in den Konzentrationen [2,5 LU/ml]; [5 LU/ml]; [12,5 LU/ml]; [25 LU/ml] und [50 LU/ml] vorhanden. Zur Überprüfung der stimulatorischen bzw. zytotoxischen Eigenschaften der Antikörper selbst wurden auch Zellen nur mit aufgereinigtem IgG in den genannten Konzentrationen an SEB/SEC1 spezifischen IgG Antikörpern versetzt. Als Positivkontrolle diente der alleinige Zusatz von Superantigen, während Zellen im unstimulierten Zustand die Negativkontrolle darstellten. Es folgte eine 72-stündige Stimulation bei 37°C und 5% CO₂ der in Triplikaten ausgeführten stimulierten und unstimulierten Ansätze. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden 25 µl ³[H]-Thymidin Lösung [0.5 µCi/Ansatz] zu jeder Kavität pipettiert und die Zellen für 24 Stunden damit gepulst. Die Zellen wurden hiernach mittels eines Zellerntegerätes auf Filterpapier transferiert und mit destilliertem Wasser nachgespült, wodurch die Zellen lysierten und somit die DNA freisetzen. Die benetzten Stellen des Papiers wurden anschließend ausgestanzt, in Messröhrchen ausgeklopft und mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt, um die emittierte β-Strahlung zu absorbieren und so als sichtbare Strahlung (Lichtblitze) für den β-Counter zugänglich zu machen. Da die Zellproliferation direkt proportional zur DNA-Verdopplung war, gab die Messung der in der neusynthetisierten DNA eingebauten Radioaktivität Aufschluss über den Grad der Zellteilung. Die Absolutwerte wurden dabei als Mittelwert der jeweiligen Triplets in Zerfällen pro Minute (cpm) angegeben.

2.3. TLR SNPs in der AD & in-vitro Untersuchungen der Mutationen

2.3.1. Genotypisierung von TLR-2 und TLR-4 SNPs im Serum der AD Patienten

Tab.9: SNP spezifische Primer und Sonden für die Genotypisierung

Primer sowie Sonden wurden von TIB-Molbiol bezogen. ¹Zugangsnummer der Sequenz, NCBI

PRIMER + SONDEN	BASENSEQUENZ	DATENBANK ¹
TLR-2 R753Q Pst forward	5' CAT TGA AAA GAG CCA CAA AAC TGT CTT TG 3'	TLR-2 homo sapiens NP003255
TLR-2 R753Q Pst reverse	5' CAG GTA GGT CTT GGT GTT CAT TAT C 3'	
TLR-2 R677W Aci forward	5' GAT GCC TAC TGG GTG GAG AA 3'	
R677W Sonde: LC Red 640	5' TCT TCA TAA GCG GGA CTT CAT TC -p**	
R677W Sonde: Fluorescein	5' GAA CTT CAA TCC CCC CTT CAA GTT G-FI**	
TLR-4 D299G Nco forward	5' GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG 3'	TLR-4 homo sapiens NP612564
TLR-4 D299G Nco reverse	5' GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC 3'	
TLR-4 T399I Hinf forward	5' GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA 3'	
TLR-4 T399I Hinf reverse	5' ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT 3'	

MATERIAL:

Reagenzien/Enzyme	Beschreibung	Firma
QIAamp DNA Blood Mini Kit		Quiagen
Platinum Taq DNA Polymerase	[5 U/μl]	Invitrogen
<u>10-fach Reaktionspuffer:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 0.2 M Tris-HCl pH 8.4 • 5M KCl 	Invitrogen
MgCl ₂	50 mM	Invitrogen
dNTP Mix	10 mM	Eppendorf
Nco I	[10 U/μl]	Fermentas
Hinf I	[10 U/μl]	Fermentas
Pst I	[10 U/μl]	Fermentas
Xylene Cyanol		Sigma
Bromphenolblau		Sigma
EDTA		Fluka
Glycerin		Sigma
Wasser	PCR-grade	Sigma
AgaroseLE		Biozym
Ethidiumbromid-Lösung	[0.5 mg/ml]	Sigma
100 bpGene Ruler		Fermentas

Stopp-Probenpuffer:

- 0,25% Xylene Cyanol
- 0.25% Bromphenolblau
- 50 mM EDTA

Geräte	Beschreibung	Firma
Mastercycler	Gradiententhermocycler	Eppendorf
Gelkammer		Wide-Mini-Subcell
Stromversorger		EPS 601
Geldokumentationssystem	Alpha Imager 1220	Innotech

Die DNA des in Abschnitt 2.1.1. erwähnten Patientenkollektivs sowie der nun insgesamt 39 Probanden wurde hinsichtlich der in der Literatur beschriebenen TLR-2 Punktmutationen (R753Q⁽⁹⁵⁾ und R677W⁽¹⁰⁵⁾) von Dr. Ahmad-Nejad im Institut für Klinische Chemie der Universitätsklinik Mannheim genotypisiert. Parallel dazu erfolgte auch die Untersuchung der cosegregierenden TLR-4 D299G/T399I SNPs, die mit einer erhöhten Bereitschaft zu Infektionen gegenüber gram-negativen Bakterien assoziiert waren.⁽¹⁰⁶⁾

Zunächst erfolgte mit Hilfe des QIAamp Blood DNA Kits die DNA Isolierung aus Protease verdautem Serum (2 x 200 μl) nach Angaben des Herstellers, wobei die Durchführung im letzten Schritt durch Elution mit 70°C warmen Wasser modifiziert war. Für die Genotypisierungen der TLR-2 sowie der TLR-4 SNPs wurden jeweils 3 μl DNA Proben einer PCR im Gradienten Thermocycler unterzogen und für die jeweiligen 25 μl Reaktionsansätze bestehend aus 1-fach Reaktionspuffer, MgCl₂ [2 mM], dNTPs [0.2 mM], den in Tabelle 9 aufgelisteten Primern [0.4 μM] sowie der PlatinumTaq DNA

Polymerase [1U] folgende PCR Bedingungen gewählt: Die initiale Denaturierung doppelsträngiger DNA erfolgte für 3 Minuten bei 95 °C, gefolgt von den ersten 10 Zyklen bei einer Annealing Temperatur von 63 °C sowie den daran anschließenden 25 Zyklen bei einer Annealing Temperatur von 55 °C mit einer Zyklusdauer von je 30 Sekunden. Das aus der R753Q PCR hervorgegangene Amplifikat hatte eine Produktlänge von 211 Basenpaaren (bp). Trat in das für Arginin der Position 753 codierende Basentriplett **CGG** die Punktmutation **CAG** auf, so entstand dadurch die Schnittstelle für das Restriktionsenzym Pst I, welches die DNA-Sequenz **CTGCA↓G** erkannte und somit nach Pst I Verdau zwei Fragmente mit den Längen 183 bp und 28 bp ergab. Analog dazu führten die TLR-4 Punktmutationen zu Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme Nco I und Hinf I, wodurch im Fall des D299G SNPs 223 bp und 26 bp lange Fragmente entstanden, während durch den T399I SNP 376 bp und 29 bp lange Fragmente hervorgingen. Um den Erfolg des enzymatischen Verdaus festzustellen, wurden 10 µl des PCR Produktes mit 0.5 µl des entsprechenden Restriktionsenzym [0.5 U] sowie mit 2 µl des dazugehörigen Reaktionspuffers versetzt und auf 20 µl mit Wasser ergänzt. Anschließend folgte eine vierstündige Inkubation bei 37 °C und die Beendigung der enzymatischen Reaktion durch Zugabe von je 5 µl Stopp-Puffer. Der Verdau wurde nach elektrophoretischer Auftrennung (bei 100 V für 60-80 Minuten) im 2.5%-igen Agarosegel durch Visualisierung der Ethidiumbromidinterkalation unter UV-Licht überprüft (s. Abschnitt 2.4.5.). Durch Restriktionsfragmenten Längenpolymorphismus (RFLP) Analyse war somit exemplarisch bei homozygoten TLR-2 R753Q Mutationsträgern lediglich das 183 bp Produkt zu sehen, während heterozygote TLR-2 R753Q Mutationsträger sowohl die 211 bp Bande als auch die 183 bp Bande zeigten. Zur Detektion der TLR-2 R677W Mutation wurden 10 µl des entsprechenden PCR Produktes (der TLR-2 R753Q Pst forward Primer fungierte gleichzeitig für die R677W PCR) mit je 0.15 µM der sequenzspezifischen Hybridisierungs sonden [Tab.9] versetzt und über die am LightCycler erstellte Schmelzkurve analysiert.

- **Prinzip der Schmelzkurvenanalyse:**

Die Schmelzkurvenanalyse erlaubte den Nachweis von Sequenzvariationen innerhalb amplifizierter DNA Fragmente. Grundlage hierfür war die für jede doppelsträngige DNA (dsDNA) spezifische Schmelztemperatur T_m , bei der 50% der DNA als Doppelstrang und 50% als Einzelstrang vorlag. Der Testablauf selbst basierte zunächst auf der Bindung der Hybridisierungssonden mit einem kurzen Abstand von 1-5 bp zueinander, wobei jeweils eine Sonde den Bereich der Punktmutation umfasste. Das 5' Oligonukleotid („Donor“)

war am 3' Ende mit einem Fluorescein markiert, während am 5' Ende des 3' Oligonukleotids („Acceptor“) LightCycler-Red 640 (LC Red 640) gekoppelt war. Wurde nun die erste Sonde angeregt, so übertrug es die Energie auf das 3' Oligonukleotid, welches daraufhin rote Fluoreszenz emittierte (FRET-Prinzip: fluorescence resonance energy transfer). Die Messung des Signals erfolgte einmal pro Zyklus nach dem Primer Annealing, da zu diesem Zeitpunkt eine Bindung der Hybridisierungs sonden an die Ziel DNA mit anschließendem Energietransfer stattfand. Ein Temperaturanstieg von 0.2°C pro Sekunde bedingte nun die Ablösung der Sonden von der Ziel DNA bei Erreichen einer bestimmten Temperatur und somit eine Abnahme des Fluoreszenzsignals. Lag die gewünschte Punktmutation vor, so fiel die Hybridisierungssonde aufgrund fehlender Basenpaarung bereits bei einer niedrigeren Temperatur von der DNA ab. Um die spezifische Schmelztemperatur T_m als Peak ablesen zu können, wurden die Schmelzkurven als erste negative Ableitung dargestellt. Im Fall eines heterozygoten Mutationsträgers erhielt man also zwei Peaks; der Schmelzpunkt bei niedriger Temperatur entsprach dem mutierten Gen, während der Schmelzpunkt des Wildtyp-Gens bei höherer Temperatur lag.

2.3.2. Zielgerichtete Mutagenese zur Generierung mutierter TLR-2 Konstrukte

Tab.10: Beschreibung der SNP spezifischen Primer für die Mutagenese

Das für den Aminosäureaustausch codierende Basentriplett mit der enthaltenden Punktmutation ist rot markiert. Die Primer wurden bei MWG-Biotech synthetisiert.

PRIMER	BASENSEQUENZ	LÄNGE	T_m [°C]	GC [%]
R753Q sense	5' AGCGCTTCTGCAAGCTG CAG AAGATAATGAACACC 3'	35-mer	79.2	48.6
R753Q as	5' GGTGTTTCATTATCTT CTG CAGCTTGCAGAAGCGCT 3'			
P681H sense	5' AAGCGGGACTTCATT CAT GGCAAGTGGATCATTGAC 3'	36-mer	79.3	47.2
P681H as	5' GTCAATGATCCACTTGCC ATG AATGAAGTCCCGCTT 3'			

MATERIAL:

Reagenzien/Enzyme	Beschreibung	Firma
QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit	<ul style="list-style-type: none"> 10-fach Reaktionspuffer DNA Polymerase [2.5 U/μl] QuickSolution dNTPs Dpn I Restriktionsenzym [10 U/μl] 	Stratagene
Geräte	Beschreibung	Firma
Mastercycler	Gradiententhermocycler	Eppendorf

Im Focus dieser Arbeit stand die nähere Charakterisierung des TLR-2 R753Q SNPs, welches klinischen Daten zufolge mit einer höheren Inzidenz zur *S. aureus* Besiedlung assoziiert war. Die funktionellen Eigenschaften sowie die Schwere dieser Mutation sollten durch direkten Vergleich mit einer weiteren TLR-2 Mutante erörtert werden, die in der Signaltransduktion durch Austausch des hierfür essentiellen Prolins in der Position 681 der TIR-Domäne erheblich gestört war. Für die in-vitro Untersuchungen wurden zunächst die R753Q bzw. P681H SNPs in den codierenden Bereich der humanen TLR-2 cDNA mittels des Quick Change XL Site Directed Mutagenesis Kit nach Herstellerangaben eingebaut. Das TLR-2 Konstrukt selbst wurde bereits über die BamH I und Xho I Schnittstellen der Polylinkerregion in den 5.4 kb großen pcDNA3 Vektor kloniert (freundliche Überlassung von Terje Espevik, Trondheim), der sich speziell für die Expression von Genen im eukaryotischen System unter der Kontrolle des konstitutiven CMV Promotors eignete. Für die Amplifikation in *E. coli* besaß der Vektor ein Gen für die Ampicillinresistenz, wohingegen für die Selektion in eukaryotischen Zellen die pcDNA3 mit einem Gen für die Neomycinresistenz ausgestattet war. Um die Punktmutation nun gezielt einzuführen, wurden zunächst geeignete Primer synthetisiert [Tab.10], wobei der eine codierend (sense) und der andere revers komplementär (antisense) zum ersten war. Laut Vorschrift sollten sie eine Länge zwischen 25 und 45 Basen haben und die gewünschte Mutation möglichst in der Mitte enthalten. Zudem sollte deren Schmelztemperatur bei über 78°C liegen und aus folgender Formel errechnet werden:

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

Dabei stand N für die Länge des Primers; %GC für die Anzahl der auftretenden GC Basen und % mismatch für die Anzahl der einzuführenden Mutationen. Außerdem war auf einen GC Gehalt von mindestens 40% zu achten. Die lyophilisierten Primer wurden in Aqua bidest auf die gewünschte Konzentration von [250 ng/µl] eingestellt und für 30 Minuten unter Schütteln resuspendiert. Hiernach wurde ein PCR Ansatz mit jeweils 0.5 µl der sense und antisense (as) Primer [125 ng], 20 ng des dsDNA Templates, 5 µl des 10-fach Reaktionspuffers, 1 µl des dNTP-Mix sowie mit 3 µl QuickSolution pipettiert, wobei der letzte Zusatz die Amplifikationseffizienz steigerte. Der Ansatz wurde daraufhin mit Aqua bidest auf ein Endvolumen von 50 µl ergänzt und mit 1 µl PfuTurbo DNA Polymerase [2.5 U] versetzt, die im Vergleich zur gewöhnlichen Taq Polymerase mit höherer Genauigkeit replizierte. Es folgte eine PCR mit dem in Tabelle 11 dargestelltem Reaktionsprofil, wobei die Polymerisationsdauer aufgrund des 8.3 kb großen Plasmids

(5.4 kb pcDNA3 + 2.2 kb TLR-2 + 0.7 kb GFP) neun Minuten pro Zyklus betrug. Aus der Mutagenese gingen folgende Sequenzvariationen hervor: **R753Q: CGG→CAG** und **P681H: CCT→CAT**. Nach der PCR wurden die parentalen DNA Stränge durch Zugabe von 1 µl des methylierungsspezifischen Restriktions-enzym Dpn I [10 U] (Erkennungssequenz: 5'-**Gm↓ATC-3'**) und einstündiger Inkubation bei 37 °C abgebaut, während Dpn I nicht auf die neusynthetisierte DNA wirkte. Abbildung 5 stellt zusammenfassend den Ablauf der Mutagenese dar.

Tab.11: PCR Profil für die TLR-2 Mutagenese

SEGMENT	ZYKLENSZAHL	T[°C]	ZEIT
1	1	95	1 min
2	18	95	50 sec
		60	50 sec
		68	1 min / kb Plasmid
3	1	68	7 min

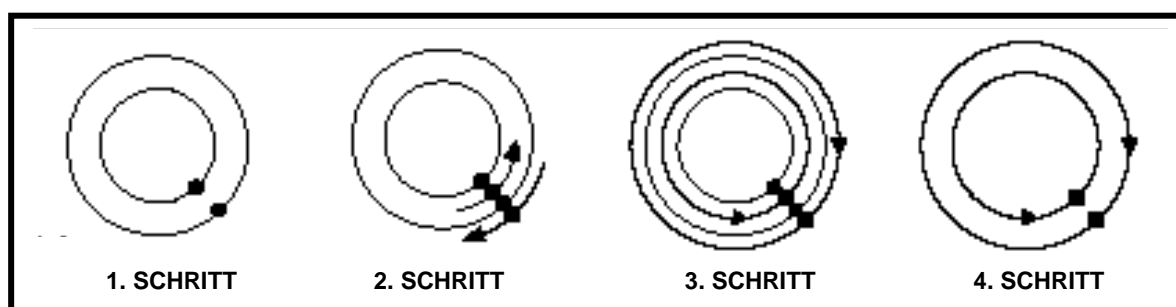


Abb.5: Schema zur zielgerichteten Mutagenese

An dem Ausgangsplasmid mit der zu mutierenden Sequenz (1.Schritt) binden die Mutageneseprimer während der PCR (2.Schritt) und ermöglichen die Amplifikation des Templates sowie den gleichzeitigen Einbau der Mutation mit Hilfe der Pfu Polymerase (3.Schritt). Nach Beendigung der PCR folgt der Abbau der methylierten parentalen Stränge (4.Schritt), die allerdings noch durch die Primer erzeugten Einzelstrangbrüche aufweisen.

2.3.3. Transformation von mutierter Plasmid-DNA in *E. coli* XL10-Gold

MATERIAL:

Reagenzien	Beschreibung	Firma
XL10-Gold	ultrakompetente Bakterien; bei -80 °C	Stratagene
β-Mercaptoethanol		Stratagene
Agar-Agar		Merck
LB-Broth Pulver		Gibco™/Invitrogen
Aqua ad iniectionabilia	1000 ml; pyrogenfrei	Braun
Ampicillin	[100 mg/ml]; sterilfiltriert bei -20 °C	Sigma
NZY Pulver		IDG
MgCl ₂ -Hexahydrat	1 M Lösung; sterilfiltriert bei -20 °C	Merck

Glucose	2 M Lösung; sterilfiltriert bei -20 °C	Merck
NaOH		Merck

LB (Luria-Bertani)-Medium: 20 g LB-broth Pulver in 1l Aqua dest. lösen und autklavieren (121 °C, 2 bar, 20 Minuten). Zum Herstellen von LB-Selektivplatten dem Medium vor dem Autoklavieren 14.8 g/l Agar-Agar und danach Ampicillin [100 µg/ml] zusetzen, bevor das Medium in Petrischalen gegossen wird.

NZY-Medium 22 g NZY Pulver in 1l Aqua dest. lösen, mit NaOH auf pH 7.5 einstellen und autklavieren (121 °C, 2 bar, 20 Minuten). 5 ml des Mediums mit 50 µl 1 M MgCl₂ und 50 µl 2 M Glucose versetzen

Verbrauchsmaterial	Beschreibung	Firma
--------------------	--------------	-------

Petrischalen		
--------------	--	--

Geräte	Beschreibung	Firma
--------	--------------	-------

Ikamag® Magnetrührer pH-Meter	InoLab pH Level 2	IKA-Labortechnik Wissenschaftlich- Technische Werkstätten
Thermomixer comfort Wasserbad Brutschrank		Eppendorf Mettler Heraeus Instruments

In Anwesenheit von Calciumionen und bei niedrigen Temperaturen erlangen Bakterien die Kompetenz zur DNA Aufnahme, welche zusätzlich durch Hitzeschock erleichtert wird. Diese als Transformation bezeichnete Methode ermöglichte eine Vervielfältigung des mutierten Plasmids in den Bakterienzellen. Hierbei wurden ultrakompetente *E. coli* Zellen des Stammes XL10-Gold verwendet, die für die Endonuklease als auch Rekombinase Aktivität defizient waren. Dadurch wurde nicht nur die Ausbeute der Plasmid-DNA nach der späteren Aufreinigung (s. Abschnitt 2.3.4. und 2.3.6.) deutlich erhöht, sondern vor allem eine stabile Replikation des Plasmides gesichert. Außerdem waren die Bakterien in der Lage, die noch vorhandenen Einzelstrangbrüche in den Plasmiden zu ligieren. Zum Versuchsablauf selbst: Zunächst wurden 45 µl der auf Eis aufgetauten, ultrakompetenten Bakterien mit 2 µl β-Mercaptoethanol versetzt, um die Transformationseffizienz zu steigern. Dem schloss sich eine 10-minütige Inkubation auf Eis an, wobei die Zellen alle zwei Minuten leicht geschwenkt wurden. Nun folgte die Zugabe von 2 µl des Dpn I verdauten PCR Produktes aus dem vorigen Abschnitt mit anschließend 30-minütiger Inkubation auf Eis. Anschließend wurde die Zellsuspension im 42 °C warmen Wasserbad für 30 Sekunden einem Hitzeschock ausgesetzt und hiernach sofort für zwei Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 500 µl des auf 42 °C erwärmten NZY Mediums wurde der

Transformationsansatz für eine Stunde bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt, im Anschluss daran auf Ampicillin LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. In Anwesenheit des Antibiotikums konnten gezielt Bakterien mit dem erfolgreich transformierten Plasmid selektioniert werden.

2.3.4. Isolierung von mutierter Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

MATERIAL:

Reagenzien	Beschreibung	Firma
QIAprep Miniprep		Quiagen
Geräte	Beschreibung	Firma
Biofuge fresco Tischzentrifuge Schüttelinkubator	Rotor: #3328	Sorvall Heraeus GFL

Die rasche Isolierung von mutierter Plasmid-DNA zur Überprüfung der Transformanten auf das gewünschte DNA-Fragment war aus kleinen Volumina der entsprechenden Bakterienkultur mit Hilfe eines kommerziellen Kits möglich. Hierfür wurden zunächst einzelne Bakterienkolonien in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin [100 µg/ml] aufgenommen und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Da sich die Zellen zu diesem Zeitpunkt am Übergang von exponentieller zur stationären Phase befanden, überwog der Anteil an DNA nach der Zellernte (20-minütige Zentrifugation bei 3500 x g und 4 °C). Das Pellet wurde anschließend in 250 µl P1 Puffer resuspendiert und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Hiernach wurden die Zellen durch Zugabe von 250 µl P2 Puffer (5-mal vorsichtig invertieren) durch Komplexbildung des Detergenz SDS mit den Phospholipiden der Membran lysiert. Gleichzeitig bewirkte das NaOH die Denaturierung der Nukleinsäuren und Proteine, während die RNase freigewordene RNA degradierte. Nach Zugabe von 350 µl N3 Puffer (saure 3M Kaliumacetat Lösung) und vorsichtigem Schwenken erfolgte nicht nur eine Neutralisierung des alkalischen Lysats, sondern auch durch Anwesenheit der hohen Salzkonzentration eine Renaturierung der Plasmid-DNA. Das entstandene weiße Präzipitat wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C vollständig sedimentiert und der Überstand auf die Säule pipettiert. Nun konnten bis zu 20 µg DNA an die positiv geladenen DEAE-(Diethylaminoethanol) Gruppen der Silicamatrix binden. Restliche Komponenten des Überstandes wurden durch einminütige Zentrifugation bei 4000 rpm entfernt, gefolgt von einem Waschschrift der Säule mit 750 µl PE Puffer unter gleichen Zentrifugationsbedingungen. Schließlich wurde die Säule für eine weitere Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Transferiert in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß wurden 50 µl EB Puffer zur Säule gegeben und 5 Minuten später die Plasmid-DNA unter Hochsalzbedingungen durch einminütige Zentrifugation von der Anionenaustauscher-Säulenmatrix eluiert.

2.3.5. Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Plasmid-DNA

MATERIAL:

Verbrauchsmaterial	Beschreibung	Firma
Präzisionsküvette	Quarzglas; Schichtdicke:10 mm	Hellma
Geräte	Beschreibung	Firma
Biofuge stratos BioPhotometer	Rotor: #3332	Heraeus Instruments Eppendorf

Die Konzentration doppelsträngiger Plasmid-DNA konnte spektralphotometrisch aufgrund des Absorptionsmaximums von Purin und Pyrimidin- Basen bei $\lambda=260$ nm und unter Berücksichtigung der entsprechenden Verdünnung (5 µl Probe + 95 µl TE-Puffer) gemessen werden. Bei einer Schichtdicke von 1 cm der verwendeten Quarzküvette entsprach eine Extinktion (Optische Dichte, OD) von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Zur Bestimmung von Verunreinigung durch Proteine wurde zusätzlich bei $\lambda=280$ nm vermessen, da hier das Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren lag. Dabei galt der Quotient A_{260}/A_{280} als Maß für die Reinheit der Probe, wobei ein Wert kleiner als 1.7 auf eine übermäßige Proteinkontamination hindeutete.

2.3.6. Präzipitation von DNA & Nachweis der Mutation durch Sequenzierung

Tab.12: Sequenzierprimer zur Detektion der TLR-2 R753Q P681H SNPs.

Die Primer wurden bei MWG-Biotech synthetisiert.

PRIMER	BASENSEQUENZ	LÄNGE	T _m [°C]
TLR-2 R753Q	5' CTT TGT GAA GAG TGA GTG GTG 3'	21-mer	62 °C
TLR-2 P681H	5' AAA ATG ATG TGG GCC TGG CT 3'	20-mer	60 °C

MATERIAL:

Verbrauchsmaterial	Beschreibung	Firma
Natriumacetat Ethanol	absolut	Merck Roth

Durch Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde auf das Vorhandensein der gewünschten TLR-2 Mutationen hin überprüft. Hierfür mussten zunächst 5 µg DNA durch Zugabe von 1/10 Volumenteil 3M Na-Acetat pH 5 gefällt werden. Danach wurde mit dem 2.5-fachen Volumen absolutem Ethanol aufgefüllt und für 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Durch 30-minütige Zentrifugation bei 20.000 rpm und 4°C erhielt man schließlich die präzipitierte DNA, die luftgetrocknet zur Sequenzierung unter Anwendung des jeweiligen Primers [Tab.12] an MWG-Biotech verschickt wurde. Die Erstellung des Primers richtete sich dabei nach einer Länge von ~20 Basen und einem T_m von ~60°C; letzteres ließ sich nach der sogenannten „Wallace Formel“ wie folgt errechnen: $T_m = (A+T)/2 + (G+C)/4$

2.3.7. Isolierung von mutierter Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

MATERIAL:

Reagenzien	Beschreibung	Firma
Isopropanol HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Inhalt wie folgt:	Merck Quiagen
<u>P1 (Resuspensions) Puffer:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mM Tris-HCl pH 8.0 • 10 mM EDTA • 100 µg/ml Rnase A 	
<u>P2 (Lysis) Puffer:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 0.2 M NaOH • 1% SDS (w/v) 	
<u>P3 (Neutralisations) Puffer:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 3 M Kaliumacetat pH 5.5 	
<u>QBT (Equilibrations) Puffer:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 0.75 M NaCl • 50 mM MOPS pH 7.0 • 15% Isopropanol (v/v) • 0.15% Triton X-100 	
<u>QC (Wasch) Puffer:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 1 M NaCl • 50 mM MOPS pH 7.0 • 15% Isopropanol (v/v) 	
<u>QF (Elutions) Puffer:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 1.25 M NaCl • 50 mM Tris-HCl pH 8.5 • 15% Isopropanol (v/v) 	
<u>TE Puffer:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mM Tris-HCl pH 8.0 • 1 mM EDTA 	

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde erneut unter Anwendung eines kommerziellen Kits eine Plasmidpräparation im nun großen Maßstab vorgenommen, um für die späteren Analysen einen größeren Vorrat des gewünschten Konstrukts zu erhalten. 150 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurde mit 300 µl einer Vorkultur des

gewünschten Klons inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Hiernach wurde die Kultur auf drei 50 ml-Röhrchen verteilt und für 15 Minuten bei 6000 x g und 4 °C geerntet. Nach Resuspension des ersten Pellets mit 10 ml P1 Puffer wurden die weiteren Pellets in derselben Suspension aufgenommen und somit vereinigt. Es folgte die Zugabe von 10 ml P2 Puffer und eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, um die Bakterien zu lysieren. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml eiskaltem P3 Puffer versetzt und direkt auf die QIA Filter Säule aufgetragen. Zehn Minuten später wurde das Plasmid enthaltene Lysat durch Auftragen auf die zuvor mit 10 ml QBT Puffer equilibrierten Säule vom Präzipitat, bestehend aus chromosomaler DNA und Proteinen, getrennt. Unter den gegebenen pH und Salzbedingungen konnte nun die Plasmid-DNA an die Anionenaustauscher-Säule binden. Nach zweimaligen Waschen mit je 30 ml QC Puffer erfolgte schließlich durch Zugabe von 15 ml QF Puffer die Elution der Plasmid-DNA in ein 50 ml-Röhrchen. Der Zusatz von 10.5 ml Isopropanol mit anschließender 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur führte zur Fällung der DNA. Das Eluat/Isopropanol Gemisch wurde hiernach durch den QIA Präzipitator filtriert und mit 2 ml 70%-igen Ethanol gewaschen. Zur Entfernung des restlichen Ethanols wurde die Membran mehrmals luftgetrocknet. Durch Zugabe von 500 µl TE Puffer wurde die DNA von dem Präzipitator eluiert und zwecks höherer DNA-Ausbeute das Eluat selbst nochmals hierdurch filtriert. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurde die Plasmidlösung auf 1 mg/ml mit TE Puffer eingestellt und bei –20 °C gelagert.

2.3.8. Kultivierung & Mykoplasmentest von HEK293 Zellen

- Auftauen, Passagieren & Einfrieren:

MATERIAL:

Reagenzien	Beschreibung	Firma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	mit stabilen Glutamin	Biochrom
Trypsin/EDTA	10-fach	PAA
DMSO		Roth
Verbrauchsmaterial	Beschreibung	Firma
Stabpipette	10 ml; steril	Greiner bio-one
Kryo-Röhrchen	1.8 ml; steril	Nalgene
Zellkulturflaschen	25 cm ² und 80 cm ² ; steril durch TC Beschichtung (Carboxyl- und Hydroxygruppen) Zelladhäsion möglich	Nunc

Einfrierbehälter	kühlt mit 1 °C/min runter	Nalgene
Geräte	Beschreibung	Firma
elektrische Pipettierhilfe Wasserbad		Hirschmann Laborgeräte Julabo R5

Zur in-vitro Charakterisierung der mutierten TLR-2 Konstrukte eigneten sich HEK293 Zellen als Modellsystem. Hierbei handelte es sich um eine humane embryonale Nierenfibroblastenzelllinie epithelialen Ursprungs, die durch Transformation den Adenovirus Typ 5 verfügte und zudem für die Expression von TLR-2 defizient war. Zum Auftauen der Zellen wurde zunächst 10 ml DMEM-Glutamax Medium, welches mit stabilen Glutamin und hitzeinaktiviertem FCS [10%] supplementiert war, in eine 25 cm² Kulturflasche vorgelegt und bei 37 °C und 5% CO₂ vorgewärmt. Um in flüssigen Stickstoff gelagerte Zellen zu rekultivieren, wurde die tiefgefrorene Zellsuspension sofort auf Eis gestellt und hiernach im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Unmittelbar danach wurde der Inhalt des Einfrier Röhrchens mit einer Stabpipette aufgezogen und durch vorsichtiges Aufziehen des vorgewärmten Mediums das enthaltene DMSO ausgedünnt. Die Suspension wurde anschließend in ein 15 ml-Röhrchen überführt und durch fünfminütige Zentrifugation bei 150 x g und Raumtemperatur gewaschen. Nun wurde das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert und in dieselbe 25 cm² Kulturflasche überführt, in welche es bereits vorgewärmt wurde. Bei Erreichen der Konfluenz im Inkubator wurde das Medium entfernt und 10 ml PBS/Trypsin-EDTA (1-fach konzentriert) zur Ablösung des adhären Zellenrasens gegeben. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 350 x g und Raumtemperatur wurde das Pellet zweimal mit je 10 ml PBS unter gleichen Zentrifugationsbedingungen gewaschen. Die Zellen wurden schließlich in 20 ml DMEM-Glutamax Medium aufgenommen und in eine mittelgroße (80 cm²) Kulturflasche überführt. War auch diese Flasche konfluent, so folgte von diesem Zeitpunkt an das Passagieren, d. h., dass nach Abtrypsinieren und Waschen mit dem jeweils gleichen Volumenäquivalent der Kultur 1/4 bzw. 1/5 der Zellen in eine neue mittlere Flasche umgesetzt wurden, um zweimal die Woche einen Mediumwechsel mit Antibiotikazusatz (1% Peni-cillin/Streptomycin) vorzunehmen sowie gleichzeitig die Zellen längerfristig zu kultivieren. Da jedoch nach 30 Passagen Veränderungen des Phänotyps auftraten, wurden vorher bereits neue Zellen aufgetaut und hochgezogen. Das Anlegen eines solchen Zellpools war dabei mittels Kryokonservierung möglich, indem Zellen in der exponentiellen Phase bei 4 °C geerntet und hiernach mit hitzeinaktivierten FCS auf eine Dichte von 1 x 10⁷/ml eingestellt und mit 1/10 DMSO versetzt wurden. Unmittelbar danach wurde die Zellsuspension in 1 ml

Aliquots auf die vorgekühlten Einfrierröhrchen verteilt und in einem mit 250 ml Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter zunächst bei -80°C über Nacht eingefroren, während die dauerhafte Lagerung bei -196°C über flüssigen Stickstoff erfolgte. Die hohe Dielektrizitätskonstante von DMSO verhinderte zwar die Bildung von Eiskristallen bei tiefen Temperaturen, bewirkte jedoch oberhalb und im Bereich des Gefrierpunkts die Solubilisierung der Zellmembran. Um die toxischen Eigenschaften von DMSO zu minimieren, musste deshalb bis zum Zeitpunkt des Einfrierens ständig gekühlt und zusätzlich sehr rasch gearbeitet werden.

- **Mykoplasmentest mittels PCR:**

Unspezifische Zellaktivierungen durch Mykoplasmen Kontaminationen ließen sich durch regelmäßige Analysen des Zellkulturüberstandes mittels eines kommerziellen Kits (Firma: VenorGeM) ausschließen. Das Testprinzip beruhte auf der spezifischen Amplifikation der 16S rRNA-Region des Mykoplasmen Genoms durch PCR. Mit diesem System konnten 1 bis 5 fg DNA nachgewiesen werden, die laut Herstellerprotokoll 2 bis 5 Mykoplasmen je Probenvolumen entsprachen. Das PCR Produkt selbst hatte eine Länge von ca. 270 bp, während die Interne Kontroll-DNA ein 191 bp langes Produkt ergab und auf eine fehlerfreie PCR hindeutete. Die lyophilisierten Reagenzien wurden zunächst für 5 Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugiert, anschließend die Primer/Nukleotide, die Positivkontrolle und die Interne Kontrolle in den entsprechenden Volumina an sterilem, deionisiertem Wasser für 5 Minuten bei Raumtemperatur gelöst und hiernach aliquotiert bei -20°C gelagert. Für die Gewinnung des Probenmaterials wurden die Zellen mindestens eine Passage vorher in Antibiotika freiem Medium kultiviert (Antibiotika drücken die Mykoplasmen Konzentration unter der Nachweisgrenze), 100 μl hiervon bei 90 bis 100% Konfluenz in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und anschließend auf 95°C für 5 Minuten erhitzt. Zur Entfernung der Zelltrümmer folgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und für 5 Sekunden. Die aus dem Überstand gewonnene Probe war nun bis zu zwei Wochen bei 4°C haltbar. Bezüglich der PCR wurden pro Ansatz 12.5 μl HotStarTaq Mastermix (s. Abschnitt 2.4.4.), 2.5 μl Primer/Nukleotid sowie 1 μl interne Kontroll-DNA gemischt, auf 20 μl mit deionisiertem Wasser aufgefüllt und anschließend entweder mit 5 μl der zu untersuchenden Probe, 5 μl Positivkontrolle oder 5 μl steriles, deionisiertes Wasser als Negativkontrolle versetzt. Dem schloss sich eine PCR mit folgendem Profil an: Der erste Zyklus mit 15 Minuten bei 94°C diente der Aktivierung der Taq Polymerase. Hiernach folgten 35 Zyklen, in denen die Proben jeweils 30 Sekunden auf 94°C , auf 55°C und auf 72°C erhitzt wurden. Im letzten Schritt wurden die Proben

für 5 Minuten bei 72 °C erhitzt und auf 4 °C abgekühlt. Jeweils 5 µl des mit Ladepuffer vermischten PCR-Produktes wurden in einem 5 mm dicken und 1.5%-igen Agarosegel aufgetragen und nach elektrophoretischer Auftrennung bei einer Spannung von 100 V sichtbar gemacht (s. Abschnitt 2.4.5.). War lediglich die Bande der Internen Kontrolle zu erkennen, so lag keine Mykoplasmen Kontamination vor. Waren die Zellen hingegen schwach kontaminiert, so ergab sich zusätzlich die Bande des 270 bp großen Mykoplasmen Amplikons, die bei übermäßiger Bildung die Bandenintensität der Internen Kontrolle abschwächte.

2.3.9. Transiente Transfektion von HEK293 mit Wildtyp (wt) und mutiertem (mt) TLR-2 Konstrukt mittels Lipofektion

MATERIAL:

Reagenzien/Stimulanzen	Beschreibung	Firma
Lipfectamine™2000	1.5 ml ; [1 mg/ml]	Invitrogen
Opti-MEM		GIBCO/Invitrogen
Pam3Cys	5 mg Lyophilisat	EMC microcollections
MALP-2	[100 µg/ml]	Alexis
Verbrauchsmaterial	Beschreibung	Firma
24-Well Platte mit Deckel		Nunc
6-Well Platte mit Deckel		Nunc

Die Schwere der TLR-2 R753Q Punktmutation in der heterozygoten sowie homozygoten Situation konnte im HEK293 Zellsystem nicht nur wegen fehlendem endogenen TLR-2, sondern vielmehr durch die Präsenz der Hauptkomponenten des TLR-Signalweges erörtert werden. Möglich war dies nach dem Prinzip des Liposomenvermittelten Gentransfers unter Anwendung von Lipofectamine™, welches ein Gemisch aus dem polykationischen Lipid 2,3-Dioleoyloxy-N-[2(Sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-Dimethyl-1-Propanaminium-Trifluoroacetate (DOSPA) sowie dem neutralen Helferlipid Dioleoyl-Phosphatidylethanolamine (DOPE) als Analogon eines natürlichen Membranbestandteils im Verhältnis von 3:1 darstellte. In wässrigen Lösungen bewirkte das Transfektionsreagenz die Bildung eines nach außen positiv geladenen und die DNA umschlossenen Liposomenkomplex, welcher mit der Membran der Zielzelle fusionierte und somit die DNA direkt in das Zytoplasma brachte. Das gewünschte Genprodukt ließ sich in diesem Fall durch Kotransfektion eines NFκB- Luciferase Reportergens (eine freundliche Überlassung von Carsten Kirschning des Instituts für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München) anhand seiner

spezifischen Enzym-Substrat-Reaktion indirekt detektieren, da das Luciferasegen unter der Kontrolle eines NF κ B Promotors stand. Die für TLR-6 und TLR-9 codierenden Plasmide waren eine freundliche Überlassung von Terje Espevik, Trondheim.

- **Protokoll zur Dosis-Wirkungsbeziehung von TLR-2 (wt bzw. mt) sowie TLR-9**

Eine Überlegung die heterozygote Mutation und damit die Präsenz von lediglich einem funktionellem TLR-2 in-vitro zu simulieren, war die Kombination von 50% Wildtyp und 50% mutiertem TLR-2 Konstrukt. Dies wiederum setzte eine dosisabhängige TLR-2 vermittelte Antwort nach Stimulation voraus. Um außerdem zu klären, inwiefern sich die mutierten Konstrukte additiv bzw. inhibierend in Anwesenheit des Wildtyp-Rezeptors verhielten, musste ihre dosisabhängige Antwort in alleiniger Form vorerst charakterisiert werden. Eine Titration mit TLR-9 zur Verdeutlichung der ausbleibenden Antwort bei einem klassischen TLR-2 Stimulus wurde ebenso durchgeführt. Der Versuchsablauf gestaltete sich nun folgendermaßen, dass HEK293 nach lichtmikroskopischer Auszählung mit einer Neubauer-Zählkammer auf eine Zelldichte von $0.2 \times 10^6/500 \mu\text{l}$ Antibiotika freiem DMEM-Glutamax Medium [10% hitzeinaktiviertes FCS] eingestellt, hiernach auf eine 24-Well Platte ausgesät und zum Erreichen einer 90%-igen Konfluenz für 48 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert wurden. Für die Transfektion wurden alle Konstrukte (TLR-2 wt; TLR-2 R753Q; TLR-2 P681H und TLR-9) jeweils in den Mengen [0 μg]; [0.25 μg]; [0.5 μg] und [1 μg] zusammen mit je 0.25 μg NF κ B Reporter in einem Gesamtvolumen von je 50 μl Opti-MEM eingesetzt. Da in einem Verhältnis von 1:1 mit Lipofectamine™ transfiziert wurde, erfolgte auch für jede DNA Menge die Zugabe des entsprechenden Anteils an Transfektionsreagenz, d. h. also [0.25 μl]; [0.5 μl]; [0.75 μl] und [1.25 μl], in einem Volumen von je 50 μl Opti-MEM. Die Besonderheit dieses Mediums beruhte auf der niedrigen Konzentration von Rinderserum, wodurch die Proliferationsrate der Zellen gefördert wurde. Zur Bildung des DNA/Liposomen Komplexes folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, bevor die Zellen für 48 Stunden mit je 100 μl des DNA/Lipofectamine™ Gemischs transfiziert wurden. Ohne weiteren Mediumwechsel und nach nun voller TLR Expression wurden die Transfektanten für 48 Stunden mit 30 $\mu\text{g/ml}$ LTA stimuliert. Das von *S. aureus* isolierte LTA wurde im Institut für Biochemische Pharmakologie der Universität Konstanz nach dem Butanol Verfahren extrahiert und mittels einer Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie (HIC) weiter aufgereinigt⁽¹⁰⁷⁾, um die Hydrolyse des biologisch aktiven D-Alanins zu verhindern.

- **Protokoll zur Simulation der „homozygoten“ & „heterozygoten“ TLR-2 SNPs**

HEK293 Zellen wurden auf eine Dichte von 1×10^6 in 2 ml Antibiotika freiem DMEM-Glutamax Medium [10% hitzeinaktiviertes FCS] eingestellt und in eine 6-Well Platte ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz folgte die Transfektion mit je 8.75 µg Gesamt-DNA zu 10 µl Lipofectamine™ in je 500 µl Opti-MEM. Die Konstruktzusammensetzung der einzelnen Konstellationen sah dabei folgendermaßen aus:

- a) TLR-2 wt/wt ➔ 5 µg TLR-2 wt + 2.5 µg TLR-6 + 1.25 µg NFκB
- b) TLR-2 wt/R753Q ➔ 2.5 µg TLR-2 wt + 2.5 µg R753Q + 2.5 µg TLR-6 + 1.25 µg NFκB
- c) TLR-2 wt/P681H ➔ 2.5 µg TLR-2 wt + 2.5 µg P681H + 2.5 µg TLR-6 + 1.25 µg NFκB
- d) TLR-2 wt/TLR-9 ➔ 2.5 µg TLR-2 wt + 2.5 µg TLR-9 + 2.5 µg TLR-6 + 1.25 µg NFκB
- e) R753Q/R753Q ➔ 5 µg R753Q + 2.5 µg TLR-6 + 1.25 µg NFκB
- f) P681H/P681H ➔ 5 µg P681H + 2.5 µg TLR-6 + 1.25 µg NFκB

Ansatz d) diente als Kontrolle zu den heterozygoten Konstellationen, um sicherzustellen, dass die hieraus hervorgegangenen Effekte mit der Punktmutation nicht aber mit der Rezeptorinteraktion an sich zusammenhängen. 24 Stunden nach Transfektionsbeginn wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 2.5 ml Antibiotika freiem DMEM-Glutamax Medium [10% hitzeinaktiviertes FCS] resuspendiert. Danach wurden jeweils 500 µl dieser Zellsuspension auf eine 24-Well Platte verteilt und für weitere 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Dieser Schritt war insofern notwendig, da eine Aussage über unterschiedliche Induktionsstärken aufgrund der verschiedenen TLR-2 Liganden eine gleiche Transfektionseffizienz für jeden Ansatz voraussetzte. Für die anschließende 48-stündige Stimulation wurden LTA [30 µg/ml] und hitzeinaktivierter *S. aureus* [1×10^9 /ml] eingesetzt. Zur Gewinnung dieses Keimes wurde die OD einer 20 ml Übernachtskultur bei $\lambda=600$ nm vermessen und hiernach unter Zuhilfenahme des McFarland Faktors (1.0392) in der Formel $\boxed{OD / 1.0392 \times 3 \times 10^8}$ die Keimzahl pro ml bestimmt. Nach Pelletieren der Bakterien wurden diese auf 1×10^{10} /ml mit PBS eingestellt, à 1 ml aliquotiert und anschließend für 20 Minuten bei 70 °C und 300 rpm inaktiviert. Des weiteren wurden die Transfektanten mit TLR-2/1 und TLR-2/6 Liganden stimuliert, weshalb vorher eine Kotransfektion mit TLR-6 nicht jedoch mit TLR-1 erfolgte, da letzteres bereits endogen in HEK293 vorlag. Hierdurch sollte prinzipiell festgestellt werden, inwiefern das mutierte TLR-2 Konstrukt die Antwort im heterodimeren Zustand beeinflusste. Als solche Liganden kamen die synthetischen Substanzen Pam3Cys

[30 µg/ml] und MALP-2 [0.3 µg/ml] in Frage, die analog zu dreifach (Pam3Cys) bzw. zweifach (MALP-2) acetylierten Lipoproteinen waren. Lipoproteine mit drei Fettsäuren wurden über TLR-2/1 erkannt, während die Heterodimerisierung von TLR-2/6 die spezifische Erkennung von zweifach acetylierten Lipoproteinen vermittelte.

2.3.10. Luciferase Assay

MATERIAL:

Reagenzien	Beschreibung	Firma
LucLite	Luminescence Reporter Gene Assay System	PerkinElmer
Verbrauchsmaterial	Beschreibung	Firma
96-Well Platten	weiß	Nunc
Geräte	Beschreibung	Firma
Plattenluminometer		LumiStar

Nach Stimulation der Transfektanten ließ sich das zelluläre NFκB über den Luciferase Assay mittels eines kommerziellen Kits quantifizieren. Mit diesem System wurde nicht nur die Zellyse, sondern auch gleichzeitig die Luciferase-vermittelte Enzymreaktion induziert. In einem ATP abhängigen Vorgang konnte das Substrat Luciferin zunächst zu Adenyl-Luciferin umgesetzt werden, welches im Anschluss daran mit O₂ zu Adenyl-Oxyluciferin unter Lichtemission reagierte. Bestimmte Kitkomponenten dienten hierbei der längerfristigen Stabilisierung dieses Signals. Die praktische Durchführung gestaltete sich nun folgendermaßen, dass die Transfektanten zunächst in je 200 µl PBS resuspendiert und anschließend mit dem gleichen Volumenäquivalent der Substratlösung versetzt wurden. Danach folgte die Verteilung des Gemischs auf je zwei Kavitäten einer lichtundurchlässigen 96-Well Platte, um jeden Ansatz in Doppelbestimmung durchzuführen. Ein Luminometer registrierte hierbei mit Hilfe der entsprechenden Lumi32 Control Software Version 3.01-0 die emittierten Lichtsignale, die proportional zum aktivierten NFκB waren. Im Fall der Dosis-Wirkungsbeziehung konnte so der Induktionsfaktor mit zunehmender Konstruktmenge bezogen auf den TLR-freien Ansatz ermittelt werden, während der Induktionsfaktor beim „homozygoten/heterozygoten“ Transfektionssystem durch Vergleich mit dem jeweiligen unstimulierten aber gleich transfizierten Ansatz bestimmt wurde.

2.3.11. IL-8 & IP-10 ELISA

Die Kulturüberstände der 48 Stunden stimulierten „homozygoten/heterozygoten“ Transfektionsansätze aus Abschnitt 2.3.9. wurden zur quantitativen Bestimmung von IL-8 und IP-10 unter Anwendung der kommerziellen OptEIA ELISA Kits der Firma BD Biosciences eingesetzt, um die TLR-2 R753Q Mutation auch auf Effektorebene zu analysieren. Die Sekretion dieser Mediatoren erfolgte nach NFκB Aktivierung und somit nach erfolgreicher TLR-Stimulation, wobei die Eigenschaft von HEK293 zur IP-10 Freisetzung erstmalig in dieser Arbeit beschrieben wurde. Eine 96-Well Platte wurde mit je 100 µl des 1:250 in 0.1 M NaHCO₃-Puffer pH 9.5 verdünnten und gegen des jeweiligen Chemokins gerichteten Primärantikörpers über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach dreimaligen Waschen der Platte mit PBS/0.05% Tween erfolgte die Zugabe von 200 µl PBS/10% FCS je Kavität, um unspezifische Bindungsstellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur abzusättigen. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden je 100 µl der Standardverdünnungen (1.Standard:1000 pg/ml – 10.Standard: ~ 2 pg/ml) sowie der Proben aufgetragen, dem eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur folgte. Die Überstände wurden je nach Stimulationsart und des zu detektierenden Chemokins, wie nachfolgend dargestellt, unterschiedlich verdünnt:

	IL-8 :	IP-10 :
unstimuliert	1:2	1:1
LTA [30 µg/ml]	1:10	1:1
<i>S. aureus</i> [1x10 ⁹ /ml]	1:10	1:2
Pam3Cys [30 µg/ml]	1:20	1:2
MALP-2 [0.3 µg/ml]	1:40	1:4

Zur Entfernung ungebundener Chemokine schloss sich daraufhin ein fünfmaliger Waschschriff an, während die immunkomplexierten Chemokine durch Zugabe von je 100 µl 1:250 verdünnten Biotin-konjugierten Antikörper detektiert wurden. Dieser war im Vergleich zum Primärantikörper nicht nur gegen ein anderes Epitop des jeweiligen Chemokins gerichtet, sondern auch bereits vorher mit Streptavidin-Peroxidase versetzt. Durch Bindung von bis zu vier Streptavidin Molekülen an einem Biotin konnte so eine Signalverstärkung erzielt werden. Nach einstündiger Inkubation und siebenmaligem Waschen wurde durch Zugabe von je 100 µl Substratlösung die Enzymreaktion gestartet und nach blauer Farbentwicklung durch je 50 µl 2N H₂SO₄ gestoppt. Nach absorptionsphotometrischer Vermessung bei λ=450 nm gegen λ=650 nm erfolgte die automatische Konzentrationsbestimmung in Anlehnung der nach der 4-Parameter Methode erstellten Standardkurve.

2.4. Zur Lokalisation von TLR-2 auf CD4⁺ T-Zellen und dem möglichen direkten Einfluss der TLR-2 Liganden auf die T-Zelleffektorfunktion

2.4.1. Selektion von CD4⁺ T-Zellen aus PBMCs mittels magnetischer „Dynalbeads“ & die daran anschließende Kultivierung

MATERIAL:

Reagenzien/Antikörper	Beschreibung	Firma
CD4 Positive Isolation Kit Casyton		Dynal Biotech Schärfe System
α-human CD3	Clone:CLB-CD3; murin IgE; [1.5 mg/ml]	PeliCluster
α-human CD28	Clone: CD28.2murin IgG1κ; [1 mg/ml]	BD Pharmingen
Verbrauchsmaterial	Beschreibung	Firma
48-Well Platten mit Deckel Casy Cup mit Deckel	steril	Greiner bio-one Schärfe System
Geräte	Beschreibung	Firma
Casy® Zellzählgerät Roller		Schärfe System RMS

Die Anwendung von Eisenpartikeln, sogenannte „Beads“, an denen monoklonale Antikörper gegen das humane CD4 Adhäsionsmolekül konjugiert waren, ermöglichten nach Inkubation mit einem Zellgemisch die gezielte Separation der CD4⁺ Population im magnetischen Feld.

• Protokoll zur CD4 Aufreinigung:

50 ml heparinisiertes, venöses Blut von 5 nicht-atopischen Spendern wurden zu je 5 ml auf den gleichen Volumenäquivalent an 4 °C kaltem Histopaque-1077 überschichtet und für 30 Minuten bei 400 x g und 4 °C (niedrigste Beschleunigungsstufe und ausgeschaltete Bremsfunktion) zentrifugiert. Hiernach wurde die Interphase entnommen, in ein neues 15 ml-Röhrchen transferiert und mit Dynalpuffer (PBS/2% FCS) auf 10 ml aufgefüllt. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 470 x g, diesmal mit eingeschalteter Bremsfunktion. Nach Resuspension und Vereinigen der einzelnen Pellets in 10 ml Endvolumen schloss sich der letzte 10-minütige Waschschrift bei 470 x g an. In der Zwischenzeit wurde die 1:2000 verdünnte Zellsuspension am CASY® Gerät ausgezählt. Hierbei beruhte das Messprinzip auf der Verdrängung der Elektrolytlösung beim Passieren der Messpore, ein Vorgang, der abhängig vom Volumen der jeweiligen Zelle erfolgte und zur Widerstandsveränderung entlang der Kapillarstrecke führte.

Entsprechend der Zellzahl wurde nun die benötigte Menge an Beads zunächst dreimal mit je 1 ml Dynalpuffer mittels einer Magnetvorrichtung gewaschen (Resuspension der Beads im Puffer, Plazieren in den Magneten sowie Abkippen des Überstandes) und anschließend im Ausgangsvolumen desselben Puffers aufgenommen. In der Zwischenzeit wurden die PBMCs mit Dynalpuffer auf $0.5 \times 10^7/\text{ml}$ eingestellt und hiernach mit 50 μl Beads pro ml versetzt, wobei für eine optimale Auftrennung maximal 8 ml PBMCs mit 4×10^7 Zellen zu 400 μl Beads eingesetzt werden konnten. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 4°C unter gleichmäßigen Schwenken. Nach Plazieren der 15 ml-Röhrchen in den Magneten wurde der T-Zell depletierte Überstand verworfen und die Beads viermal mit je 1 ml Dynalpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Beads in 1/10 des Ausgangsvolumens aufgenommen und mit 15 μl DETACHaBEADS pro 100 μl Beadsuspension versetzt. Während der einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur unter gleichmäßigen Schwenken erfolgte so die proteolytische Abspaltung des anti-CD4 Antikörpers an der F_{ab} -Region und damit die Separation der T-Zellen von den Eisenpartikeln. Die nun positiv selektionierte T-Zellfraktion befand sich im Überstand und wurde in ein neues 15 ml-Röhrchen überführt. Daraufhin wurden die Beads dreimal mit je 1 ml RPMI-Medium gewaschen, welches mit Glutamin [2 mM], FCS [10%] und Penicillin/Streptomycin [1%] supplementiert war. Dabei wurden die restlichen, im Überstand befindlichen T-Zellen vereinigt und gegebenenfalls mit Medium auf 10 ml Endvolumen ergänzt. Während der 10-minütigen Zentrifugation bei $470 \times g$ erfolgte die Zählung einer 1:2000 verdünnten CD4⁺ T-Zellprobe am CASY® Gerät. Schließlich wurden die Zellen mit RPMI-Medium (mit oben genannten Zusätzen) auf 1.5×10^6 Zellen/500 μl eingestellt, auf eine 48-Well Platte verteilt und zunächst für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die TLR-2 Expression sowie die Reinheit der T-Zellfraktion unmittelbar nach der Aufreinigung wurde durch FACS Analyse überprüft (s. nächster Abschnitt).

- **Protokoll zur T-Zellstimulation:**

Eine neue 48-Well Platte wurde mit je 50 μl anti-CD3 [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS] beschichtet und zunächst für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden hiernach abgesaugt und 50 μl anti-CD28 [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RPMI-Medium mit Zusätzen] zu jeder Kavität pipettiert. Anschließend wurden die T-Zellen auf die CD3/CD28 beschichtete Platte transferiert und für weitere 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach voller TLR-2 Expression war nun eine Stimulation mit ausgewählten TLR-2 Liganden möglich, wodurch der direkte Einfluss von Pathogenen auf die T-Zelleffektorfunktion simuliert werden sollte. Eingesetzt wurden LTA in den Konzentrationen [30 $\mu\text{g}/\text{ml}$] und

[3 µg/ml] sowie MALP-2 in den Konzentrationen [0.3 µg/ml] und [30 ng/ml], wobei beide Liganden erstmalig in dieser Arbeit für eine T-Zellstimulation eingesetzt wurden. Vor Zugabe der jeweiligen Liganden waren jedoch ein Mediumwechsel sowie eine CD3/CD28 Restimulation erforderlich. Hierfür wurden zunächst die Zellen desselben Spenders in ein 15 ml-Röhrchen vereinigt und für 10 Minuten bei 470 x g pelletiert. Nach Aufnahme im ursprünglichen Volumen des frischen RPMI-Mediums wurden jeweils 500 µl der Zellsuspension auf eine bereits neu vorbereitete CD3/CD28 beschichtete Platte (48-Well Format) verteilt und schließlich für 72 Stunden in Anwesenheit bzw. Abwesenheit der Liganden stimuliert. Die 1:5 und 1:50 verdünnten Überstände dienten der quantitativen Bestimmung von T_H1/T_H2 Zytokinen nach der CBA Methode (s. Abschnitt 2.2.5.), während die stimulierten Zellen entweder für den qualitativen oder quantitativen Nachweis auf Transkriptebeine (s. Abschnitt 2.4.4. und 2.4.7.) bzw. für die durchflußzytometrische Charakterisierung von Oberflächenproteinen (s. nächster Abschnitt) dienten.

2.4.2. Nachweis von TLR-2 auf CD4⁺ T-Zellen durch FACS Analyse

MATERIAL:

Reagenzien/Antikörper	Beschreibung	Firma
humanes Serum	natürlich geronnen; Ø Fibrin; Ø AB-Antikörper; hitzeinaktiviert	PAA
Simultest Control γ1/γ2a Reagenz	murin IgG1 κ FITC; Clone X40 murin IgG2a PE; Clone X39	BD
Maus IgG1-APC	murin IgG1 κ; Clone X40	BD
α-human CD3-PE	murin IgG1κ PE; Clone UCHT1	BD
α-human CD4-APC	murin IgG1κ PE; Clone RPA-T4	BD
α-human CD4-FITC	murin IgG1 κ; Clone RPA-T4	BD
α-human CD45 RO-PE	murin IgG1 κ; Clone HI30	BD
α-human CD25-APC	murin IgG1 κ; Clone M-A251	BD
α-human TLR-2 FITC	murin IgG2a; Clone TL2.1; [0.1 mg/ml]	Alexis

500 µl der 1.5×10^6 CD4⁺ T-Zellen (direkt nach Aufreinigung sowie nach CD3/CD28 Aktivierung in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des TLR-2 Liganden) wurden für 10 Minuten bei 470 x g geerntet. Hiernach folgte eine 30-minütige Inkubation bei 4 °C mit 500 µl FACS-Puffer (PBS+5%FCS), welcher durch Zusatz von 1% humanem Serum Fcγ-Rezeptoren abblockte. Nach Zugabe von 1 ml FACS-Puffer wurden die Ansätze durch 10-minütige Zentrifugation bei 300 x g gewaschen, anschließend in 1.5 ml des selben Puffers aufgenommen und à 100 µl 1×10^5 CD4⁺ T-Zellen auf vier FACS-Röhrchen verteilt, die wie nachfolgend dargestellt zur direkten und simultanen Färbung von drei

verschiedenen Oberflächenproteinen dienten, um so die CD4 Population sowie die entsprechende TLR-2 Expression näher zu charakterisieren.

- a) mouse IgG1 FITC; mouse IgG2a PE; mouse IgG1 APC
- b) α -human TLR-2 FITC; α -human CD3 PE; α -human CD4 APC
- c) α -human CD4 FITC; α -human CD45RO PE; α -human CD25 APC
- d) α -human TLR-2 FITC; α -human CD45RO PE; α -human CD25 APC

Zur sauberen Färbung wurden die Zellen sukzessiv mit den entsprechenden Mengen der jeweiligen Antikörper (0.5 μ l für TLR-2 sonst 2 μ l) zunächst im 100 μ l Volumen später jedoch im verbleibenden Restvolumen für je 30 Minuten bei 4°C inkubiert und nach jedem Inkubationsschritt durch Zugabe von 1 ml FACS-Puffer unter den bereits genannten Zentrifugationsbedingungen gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 300 μ l PBS resuspendiert und am FACScan Durchflusszytometer gemessen, dessen Funktionsweise, Geräteeinstellung sowie Messprinzip nachfolgend erläutert sind.

- **Funktionsprinzip, Geräteeinstellung & Auswertung:**

Der Durchflusszytometer ermöglichte nach dem Prinzip des „Fluorescence activated cell sorting“ (FACS) eine multiparametrische Messung und Analyse bezüglich Oberflächenantigene, Größe und Granularität jeder Zelle. Dabei wurde die Zellsuspension mittels Druck in die Messkanüle geleitet und durch eine trichterartige Verengung beschleunigt, wodurch sich die Zellen in einem feinen Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander anordneten (hydrodynamische Fokussierung) und den gebündelten Strahl des Argonlasers ($\lambda=488$ nm) passierten. Die Ablenkung des Strahls um nur wenige Grad von der Einfallrichtung, auch Vorwärtsstreuung (FSC, forward scatter) genannt, stand für die Größe des zu analysierenden Partikels. Die seitliche Ablenkung dazu im 90° Winkel wurde als Seitwärtsstreuung (SSC, sideward scatter) bezeichnet und war ein Maß für die Granularität. Über diese beiden rein morphologischen Eigenschaften hinaus ließen sich zudem Oberflächenantigene der zu untersuchenden Zellpopulation durch Fluoreszenzmarkierung erfassen. Hierbei regte der Laserstrahl die jeweiligen Fluorochrome zur Lichtemission bei einer charakteristischen Wellenlänge an, die von spezifischen Detektoren erkannt sowie nach ihrer Intensität quantifiziert wurde. Im hier verwendeten FACScan Durchflusszytometer konnten simultan bis zu vier Fluoreszenzen gemessen und aufgrund ihrer verschiedenen Emissionsspektren voneinander differenziert werden. So war Phycoerythrin (PE) bei einer Emissionswellenlänge von 564-606 nm im FL-2 Kanal,

Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) bei 515-545 nm im FL-1 Kanal und Allophycocyanin (APC) bei 650-670 nm Emissionswellenlänge im FL-4 Kanal detektierbar. Optische Filter gewährleisteten eine klare Zuteilung dieser Fluoreszenzsignale zu den entsprechenden Fluorochromen, konnten jedoch nicht alle spektralen Überschneidungen verhindern, weshalb zusätzlich eine elektronische Subtraktion, die sogenannte spektrale Kompensation, nötig war. Deshalb liefen parallel zu jedem Versuch Kontrollproben mit jeweils einer der verwendeten Fluoreszenz, um festzustellen, wie stark ein bestimmter Fluorochrom in die anderen Kanäle hineinstrahlte. Für die Messung einer zusammengehörenden Versuchsreihe wurden dann identische Geräteeinstellungen beibehalten und unter Berücksichtigung der Signale von je 10.000 Zellen einzelne Untergruppen der Messereignisse „Events“ durch Auswertungsfenster sogenannte „Gates“ definiert, die im FSC/SSC Punktediagramm als „Regions“ hervorgehoben waren. Mit Hilfe der CellQuest Software Version 3.2.1f1 wurden die Proben als zweidimensionale Dot-Blot Darstellung analysiert, in der jeder Punkt eine Zelle entsprechend ihrer Fluoreszenz und Größe bzw. Granularität repräsentierte. Die Datendarstellung und -auswertung erfolgte schließlich mit Hilfe der Software WinMDI Version 2.8.

2.4.3. RNA Isolierung mittels RNeasy & Reverse Transkription (RT-Reaktion)

MATERIAL:

Reagenzien/Enzyme	Beschreibung	Firma
RNeasy Mini Kit		Quiagen
β-Mercaptoethanol		Sigma
Desoxyribonuclease I [1 U/μl]	Inhalt wie folgt:	Invitrogen
<u>Storage Buffer:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 20 mM Natriumacetat pH 6.5 • 5 mM CaCl₂ • 0.1 mM PMSF • 50% Glycerin 	
<u>10-fach Reaktionspuffer:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 0.2 M Tris-HCl pH 8.4 • 20 mM MgCl₂ • 0.5 M KCl 	
Omniscript Reverse Transcription Kit		Quiagen

Verbrauchsmaterial	Beschreibung	Firma
DNase/RNase freie Reaktionsgefäße	1.7 ml; steril	Sorenson BioScience
Insulinspritze mit Kanüle		Braun
Pipettenspitzen mit Filtereinsätzen	Pyrogenfrei, Ø DNase, RNase & DNA <ul style="list-style-type: none"> • 0.1-10 µl • 1-100 µl • 101-1000 µl 	Starlab
DNase/RNase freie Reaktionsgefäße	0.5 ml; steril	Biozym
Geräte	Beschreibung	Firma
UV/Visible Spektrophotometer	Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences
Thermoblock		HCL
Thermocycler		Biometra TRIIO

500 µl der 1.5×10^6 CD4⁺ T-Zellen (direkt nach Aufreinigung sowie nach CD3/CD28 Aktivierung in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des TLR-2 Liganden) wurden in ein DNase/RNase freies Reaktionsgefäß überführt und durch 10-minütige Zentrifugation bei 470 x g und 4°C geerntet. Anschließend wurden die Zellen in 350 µl RLT Puffer resuspendiert und durch den 10%-igen β-Mercaptoethanol Zusatz lysiert, während Guanidin-Isothiocyanat die vorhandene RNase inaktivierte. Zur vollständigen Zelllyse und somit höheren Ausbeute der RNA wurden die Zellen 5-mal durch eine 1 ml Spritze gedrückt und hiernach mit 350 µl 70%-igem Ethanol vermischt. Auf eine RNeasy Mini Säule transferiert folgte eine Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000 rpm. Die nun an der Silica-Matrix gebundene RNA wurde zunächst mit 700 µl RW1 Puffer und anschließend mit 500 µl RPE Puffer unter gleichen Zentrifugationsbedingungen gewaschen, wobei der letzte Waschschrift durch 2-minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm wiederholt wurde. Nach einminütiger Zentrifugation der leeren Säule bei Maximalgeschwindigkeit wurde die RNA schließlich durch einminütige Zentrifugation bei 10.000 rpm mit 30 µl RNase freiem Wasser in ein neues Gefäß eluiert und der Durchlauf zwecks höherer Ausbeute erneut auf die Säule aufgetragen und wie eben beschrieben zentrifugiert. Nach photometrischer Vermessung wurde die Konzentration der isolierten RNA unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ermittelt, wobei 40 µg RNA/ml einer OD_{260nm} von 1 entsprachen. Hiernach folgte ein DNase Verdau mit 1 µg Gesamt-RNA sowie 2 µl Enzym [2 U] und der gleichen Menge an 10-fach Reaktionspuffer im 20 µl Ansatz, um noch vorhandene DNA durch 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur zu degradieren. Die Zugabe von 2 µl 0.25 M EDTA mit anschließend 10-minütiger Inkubation bei 65°C beendete schließlich diese Reaktion. In einem Gesamtvolumen von 40 µl wurde

nun der komplette Ansatz unter Verwendung von 4 µl dNTPs [je 0.5 mM], 2 µl der rekombinanten reversen Transkriptase [8 U], 4 µl des entsprechenden 10-fach Reaktionspuffers sowie 2 µl der Oligo (dT)₁₈ Primer [100 pmol] zur cDNA Synthese von mRNA aufgrund Primer Bindung am entsprechenden poly-A Strang verwendet. Außerdem fand ein spezifischer RNA Abbau in RNA:DNA Hybriden durch die RNase H Aktivität des Enzyms statt. Die reverse Transkription lief im Thermocycler für 1 Stunde bei 37°C gefolgt von einer fünfminütigen Inaktivierung des Enzyms bei 93°C.

2.4.4. HotStarTaq PCR zum qualitativen Nachweis der zu untersuchenden Transkripte in CD4⁺ T-Zellen

Tab.13: Primer für den qualitativen aber vor allem quantitativen Nachweis der Genexpression

¹Zugangsnummer der Sequenz (homo sapiens) bei NCBI. Primerdesign mit gleichzeitiger Bestimmung der Produktlänge (für die Quantifizierung optimal zwischen 100 und 200 bp), Schmelztemperatur, Sekundärstrukturen und möglicher Primer-Dimere erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms GeneRunner Version 3.04. Die Primer wurden anschließend von der Firma Metabion bezogen.

PRIMER	DATENBANK ¹	BASESEQUENZ	LÄNGE	Tm [°C]	PRODUKT
TLR-2 sense	NP003255	5' GAGCAGCAAGCACTGGCCAAAG 3'	22-mer	65.9	120 bp.
TLR-2 as		5' GTGACATTCCGACACCGAGAGG 3'		65.9	
TLR-6 sense	NM006068	5' TGACCTTCCTGGATGTGGCAG 3'	21-mer	63.3	109 bp.
TLR-6 as		5' CCTCATCTTCTGGCAGCTCTGG 3'		65.9	
GATA-3 sense	NM002051	5' GGCATCCAGACCAGAAACCG 3'	20-mer	61.4	149 bp.
GATA-3 as		5' AAGGGCGAGATGTGGCTCAG 3'		61.4	
t-bet sense	AF241243	5' CGGCTGCATATCGTTGAGGTG 3'	21-mer	61.8	113 bp.
t-bet as		5' TGGTAGGCAGTCACGGCAATG 3'		61.8	
IL-13 sense	NM002188	5' AAGGCTCCGCTCTGCAATGG 3'	20-mer	61.4	152 bp.
IL-13 as		5' ACCTTGTCGCGGCAGAATCC 3'		61.4	
IL-2 sense	DQ231169	5' AACTCACCAGGATGCTCACA 3'	20-mer	57.3	105 bp.
IL-2 as		5' GCACTTCCTCCAGAGGTTTG 3'		59.4	

Um die TLR-2 sowie TLR-6 Expression in CD4⁺ T-Zellen auch auf Transkriptebeine qualitativ nachzuweisen, wurden die aus dem vorigen Abschnitt generierten cDNAs einer HotStarTaq PCR unterzogen. Außerdem diente diese Methode der Generierung von internen Standards für die Transkriptionsfaktoren GATA-3 (T_H2) und t-bet (T_H1) sowie der Zytokine IL-13 (T_H2) und IL-2 (T_H1), um später den Einfluss dieser TLR-2 Liganden auf Transkriptebeine zu quantifizieren (s. Abschnitt 2.4.7.). Pro PCR Ansatz wurden 25 µl des kommerziell erhältlichen HotStarTaq Mastermix der Firma Quiagen mit je 1 µl sense und as Primer [50 pmol] [Tab.13] sowie mit 1 µl Template versetzt und auf 50 µl Endvolumen mit Aqua bidest ergänzt. Dabei stellte der Mastermix ein Gemisch aus MgCl₂ [1.5 mM],

dNTPs [200 µM] und dem entsprechenden Puffersystem dar. Ebenso im Gemisch enthalten war die rekombinante HotStar Taq DNA Polymerase, die ursprünglich aus *Thermus aquaticus* isoliert wurde und ein Temperaturoptimum bei 72°C besaß. Neben der Stabilität des Enzyms bei 95°C konnte es zudem erst durch diese Temperatur aktiviert werden, wodurch eine Elongation unspezifischer Primeranlagerungen weitgehend verhindert werden sollte. Bis auf die TLR-2 und TLR-6 spezifische PCR, die insgesamt 35 Zyklen erforderte, waren die Bedingungen für das zyklische Temperaturprofil identisch [Tab.14]. Durch Wiederholung von DNA-Denaturierung (T=94°C), Primer-Annealing (Primer Hybridisierung am komplementären Einzelstrang der Zielregion bei T=60°C) und Elongation (Verlängerung des hybridisierten Primer Abschnittes durch Polymeraseaktivität unter Einbau der dNTPs bei T=72°C) wurden die Primer flankierten Sequenzbereiche der umschriebenen Transkripte exponentiell amplifiziert, und zwar umso spezifischer, wenn die Annealingtemperatur im Bereich der Schmelztemperatur des jeweiligen Primers lag.

Tab.14: Zyklisches Temperaturprofil für die HotStarTaq PCR

SEGMENT	ZYKLENZAHL	T[°C]	ZEIT
1	1	95	15 min
2	30	94	1 min
		60	40 sec
		72	1 min
3	1	72	10 min

2.4.5. Elektrophoretische Auftrennung und Detektion von Nukleinsäuren

MATERIAL:

Reagenzien/Enzyme	Beschreibung	Firma
Agarose	Für Nukleinsäuren > 500 bp. [10 mg/ml]	Biozym
Ethidiumbromid		Roth
Tris		Roth
Borsäure		Sigma
EDTA		Roth

10-fach TBE Puffer:

- 0.9 M Tris-HCl pH 8.0
- 0.89 M Borsäure
- 0.2 M EDTA

6-fach Ladepuffer:

- 0.2% Bromphenolblau
- 0.2% Xylencyanol
- 60 mM EDTA
- 60% Glycerin

100 bp Längenstandard	[0.5 mg/ml]; mit Eco I und Pvu I verdaut, phenolextrahiert, alkohlfällt und in 10 mM Tris-HCl pH 7.6 und 1 mM EDTA aufgenommen; 11 Banden: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 und 80 bp	peQLab
Verbrauchsmaterial	Beschreibung	Firma
Horizontale Gelvorrichtung	Gießkammer mit Probenkamm für 20 Taschen	peQLab
Geräte	Beschreibung	Firma
Stromversorger Geldokumentationssystem	Electrophoresis Power Supply EPS3500	Pharmacia MWG

Nukleinsäuren konnten aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen entsprechend ihrer Molekülgröße in einer Agarosegelmatrix elektrophoretisch aufgetrennt und durch den orangenen Farbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht ($\lambda=254$ nm) sichtbar gemacht werden, dessen aromatische Ringe mit den heteroaromatischen Ringen der Nukleinsäurebasen interkalierten. Für die Auftrennung der Produkte aus der HotStarTaq PCR im 2%-igen Gel wurden 2 g Agarose in 100 ml 1-fach TBE Puffer aufgekocht, mit 5 μ l Ethidiumbromid versetzt und anschließend in die entsprechende horizontale Gelvorrichtung mit bereits eingesetztem Probekamm gegossen. Währenddessen wurden die Proben mit der entsprechenden Menge an 6-fach Ladepuffer vorbereitet und hiervon je 5 μ l zusammen mit 5 μ l des 100 bp Längenstandards auf das erstarrte und mit 1-fach TBE Puffer überschichtete Gel aufgetragen. Die Dokumentation des Ergebnisses erfolgte nach 90-minütigem Lauf bei 100 V.

2.4.6. Aufreinigung der Amplifikate zwecks Generierung externer Standards

Zeigte die Gelelektrophorese spezifische Banden für GATA-3, t-bet, IL-13 und IL-2 mit den errechneten Amplifikatlängen [Tab.13], so konnten die jeweiligen PCR Produkte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen aufgereinigt werden. Hierzu wurden Amplifikate mit der stärksten Bandenintensität vereinigt, mit 5-fachem Volumen PB Puffer vermischt und auf die QIAquick Trennsäule aufgetragen. Durch einminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm konnte aufgrund hoher Salzkonzentration und dem sauren pH Wert des Puffers bis zu 10 μ g des spezifischen PCR Produktes an der Säule binden. Dahingegen verblieben Primer, Polymerase sowie Nukleotide im Durchlauf. Anschließend wurde die Säule mit 750 μ l PE Puffer unter eben genannten Zentrifugationsbedingungen gewaschen und hiernach die leere Säule erneut zentrifugiert. Durch Zugabe von 30 μ l Aqua bidest konnte schließlich das aufgereinigte Amplifikat unter Niedrigsalzbedingungen und basischem pH Wert nach fünfminütigem Stehen und darauffolgender

einminütiger Zentrifugation eluiert werden. Durch HotStarTaq PCR der aufgereinigten und 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶ und 1:10⁷ verdünnten Produkte konnte so bei gleichzeitigem Lauf der zu untersuchenden Ansätze die Expressionsstärke des jeweiligen Gens und damit die entsprechende Ausgangsverdünnung des 1. Standards für die quantitative PCR ermittelt werden, um dadurch den Bereich der gewünschten Amplifikate zu erfassen.

2.4.7. Relative Quantifizierung der zur cDNA umgeschriebenen GATA-3, t-bet, IL-13 und IL-2 Transkripte mittels LightCycler

MATERIAL:

Reagenzien	Beschreibung	Firma
QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit		Quiagen
<u>Reaktionspuffer:</u>		
	<ul style="list-style-type: none"> • Tris-HCl pH 8.7 • KCl und 5 mM MgCl₂ • (NH₄)₂SO₄ 	
Verbrauchsmaterial	Beschreibung	Firma
LightCycler Kapillaren	20 µl	Roche Diagnostics
Geräte	Beschreibung	Firma
LightCycler Instrument		Roche Diagnostics

Mit Hilfe der Real-Time PCR konnte die Menge der in cDNA umgeschriebenen obig genannter Transkripte unter Zuhilfenahme des interkalierenden Farbstoffs SYBRGreen im LightCycler quantifiziert werden. Basierend auf der Fluoreszenzmessung bei $\lambda=530$ nm im FL-1 Kanal am Ende jeder Elongationsphase war das emittierte Licht nach Anregung durch einen Laser proportional zur vorhandenen Transkriptmenge. Im ersten LightCycler Lauf wurde zunächst in allen Proben die Expression des nicht regulierten und unter den experimentellen Bedingungen unbeeinflussten Housekeeping Gens GAPDH anhand einer mitgeführten Standardreihe ermittelt und diese hiernach auf annähernd identische GAPDH Mengen angeglichen, um einerseits unterschiedliche Ausgangstranskriptmengen auszuschließen und andererseits Unterschiede in der Effizienz der reversen Transkription zu kompensieren. Der Erfolg der Normalisierung wurde durch einen zweiten Lauf bestätigt. Die Zyklenzahl, bei der sich erstmalig das Fluoreszenzsignal vom Hintergrundrauschen abhebt, wurde mit Hilfe der LightCycler Software Version 3.5 automatisch als Schnittpunkt (CP: Cross Point) eines definierten horizontalen Schwellenwertes festgelegt, wobei sich die Proben bei der Angleichung maximal um einen Cross Point unterscheiden durften. Zur Quantifizierung der relativen Genexpression in

den jeweiligen Proben wurden sechs jeweils 1:4 verdünnte externe Standards mit bekannter Ausgangsverdünnung (GATA-3, t-bet: 1:10⁶ und IL-2, IL-13: 1:10⁷) parallel amplifiziert und zur Erstellung der Standardkurve herangezogen. Die Auftragung des Logarithmus der initialen Standardkopienzahl in einer frei wählbaren Einheit (Units) gegen den jeweiligen CP-Wert ergab über den quantifizierbaren Bereich eine lineare Regression. Der experimentelle Ablauf gestaltete sich dabei folgendermaßen, dass pro Ansatz 12.5 µl des SYBRGreen Mastermix (HotStarTaq DNA Polymerase + Reaktionspuffer + dNTPs + SYBR Green) mit je 0.5 µl der in Tabelle 13 aufgelisteten sense und antisense Primer [25 pmol] versetzt, mit Aqua bidest auf 24 µl aufgefüllt und anschließend mit 1 µl cDNA bzw. der entsprechenden Standardverdünnung vermischt wurden. Eine Negativkontrolle mit 1 µl Aqua bidest anstelle des Templates wurde stets mitgeführt. Hiervon wurden nun 20 µl in die entsprechende Glaskapillare pipettiert, kurz anzentrifugiert und schließlich der quantitativen PCR mit dem in Tabelle 15 angegebenen Programm am LightCycler unterzogen. Das große Verhältnis von Oberfläche zu Volumen der Kapillare begünstigte dabei die kurze Zyklendauer durch rasches Aufheizen und Abkühlen der Probe. Nach Beendigung der PCR erfolgte die Aufzeichnung einer Schmelzkurve durch kontinuierlichen Temperaturanstieg von 65°C auf 95°C in 0.1°C Schritten bei gleichzeitiger Fluoreszenzmessung. Wie in Abschnitt 2.1.3. bereits beschrieben, führte die für jedes Amplifikat typische Schmelztemperatur zum Signalverlust und erlaubte somit Rückschlüsse auf die Produktspezifität, da Primer Dimere besonders bei ungünstiger Primerkonstellation dominierten und dementsprechend durch eine niedrigere Schmelztemperatur charakterisiert waren.

Tab.15: Programm zur quantitativen PCR am LightCycler

SEGMENT	ZYKLENZAHL	T[°C]	ZEIT
Denaturierung	1	95	15 min
Denaturierung	55	94	15 sec
Annealing		60	30 sec
Elongation		72	15 sec
Denaturierung	1	95	0 sec
Annealing		65	10 sec
Schmelzkurve		95	0.1°C/sec
Kühlung	1	40	30 sec

2.5. Statistik

Unterschiede zwischen zwei Experimentalgruppen wurden hinsichtlich ihrer Signifikanz im zweiseitigen Mann-Whitney U Test bzw. im zweiseitigen t-Test für ungepaarte Stichproben analysiert, während Zusammenhanganalysen mit dem Chi-Quadrat (χ^2) Test erfolgten. Der resultierende Wert p beschrieb dabei die Wahrscheinlichkeit, mit der die Stichproben einander ähnelten, wobei eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von < 0.05 gegeben war. Dabei galt für $p < 0.01$ eine zweifache Signifikanz (**) und für $p < 0.001$ eine dreifache Signifikanz (***). Die rechnerische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft Excel und GraphPrism.

3. ERGEBNISSE

3.1. Das untersuchte Patientenkollektiv ist zu einem Großteil mit *S. aureus* besiedelt und gegen Superantigene sensibilisiert

3.1.1. Das Profil der kutanen *S. aureus* Besiedlung & der Zusammenhang zur Erkrankung

60% der untersuchten Patienten (54 von 89 Patienten) wurden als Träger von *S. aureus* identifiziert, wobei etwa die Hälfte dieser Stämme Enterotoxine mit folgender Präferenz SEC1 > SEB/SEA > TSST-1 > SED sezernierten [Abb.6]. Innerhalb der toxischen Stämme waren wiederum 28% (7 von 25 Patienten) zur gleichzeitigen Sekretion von zwei Toxinen in der Lage. Dabei litten Patienten mit kutaner Staphylokokken Besiedlung unter einem deutlich schwereren Ekzem im Vergleich zu denjenigen, die nicht mit diesen Keimen besiedelt waren (Median SCORAD: 54 Punkte versus 40 Punkte), wobei sich der Schweregrad der Erkrankung hinsichtlich der Präsenz toxischer bzw. nicht-toxischer Stämme nicht weiter unterschied [Abb.7].

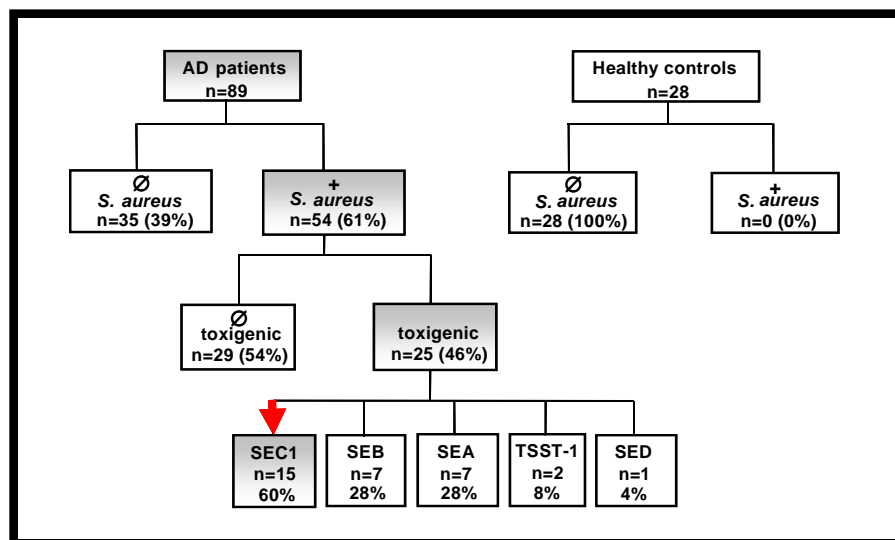


Abb.6: Häufigkeit der kutanen Besiedlung mit nicht-toxischen sowie toxischen *S. aureus* Stämmen innerhalb der AD Patienten und der hautgesunden Probanden. „Ø“: nicht vorhanden

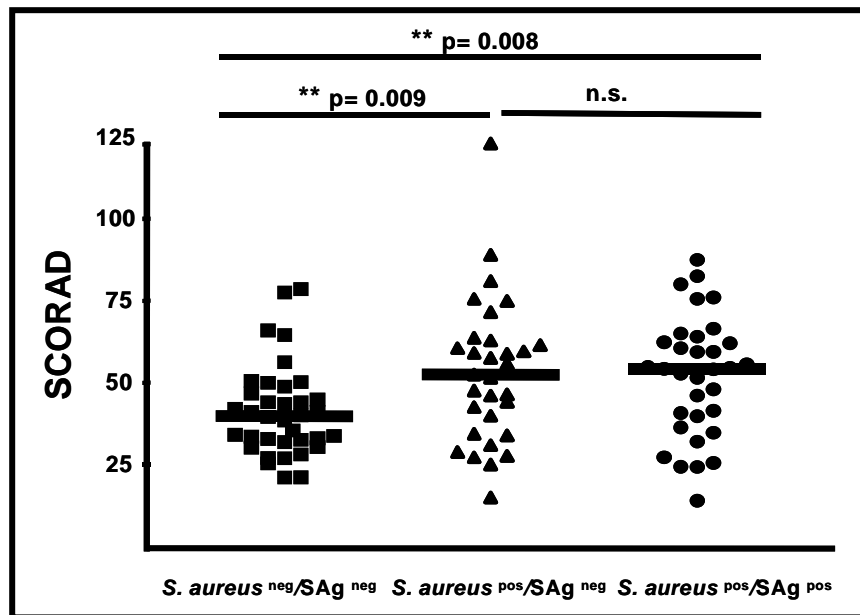


Abb.7: Schweregrad der atopischen Dermatitis gemessen am SCORAD System in Abhängigkeit der kutanen *S. aureus* Besiedlung. n=36 der untersuchten Patienten waren nicht mit dem Keim besiedelt, während n=31 eine Besiedlung mit nicht-toxischen und n=33 eine Besiedlung mit toxischen (SAg) Stämmen zeigten. Die Querbalken entsprechen den Medianwerten des SCORADs der jeweiligen Patientengruppe. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen t-Test für ungepaarte Stichproben überprüft.

3.1.2. Das Superantigen-spezifische IgE Profil der Patienten & die Assoziation zur atopischen Dermatitis

Superantigen-spezifisches IgE war in 72% der AD Patienten nachweisbar. Während annähernd die Hälfte der Patienten eine Sensibilisierung gegenüber allen Superantigenen zeigte, waren lediglich 5% gegen nur ein Superantigen sensibilisiert. Die Spezifität dieser Antikörper erschien dabei in folgender Reihenfolge: SEA > SEB > SED > TSST-1 > SEC1. Ferner korrelierte das Vorhandensein von Superantigen-spezifischem IgE mit dem Gesamt-IgE des Serums [Abb.8A] sowie mit dem Schweregrad des Ekzems [Abb.8B]. Der Median des Gesamt-IgE war dabei im Vergleich zu den nicht-sensibilisierten Patienten um fast das 17-fache erhöht (7700 kU/l versus 460 kU/l), während Patienten mit Superantigen-spezifischem IgE unter einem schweren Ekzem (Median SCORAD: 55 Punkte) und Patienten ohne solche Antikörper unter einem mittelschweren Ekzem (Median SCORAD: 30 Punkte) litten.

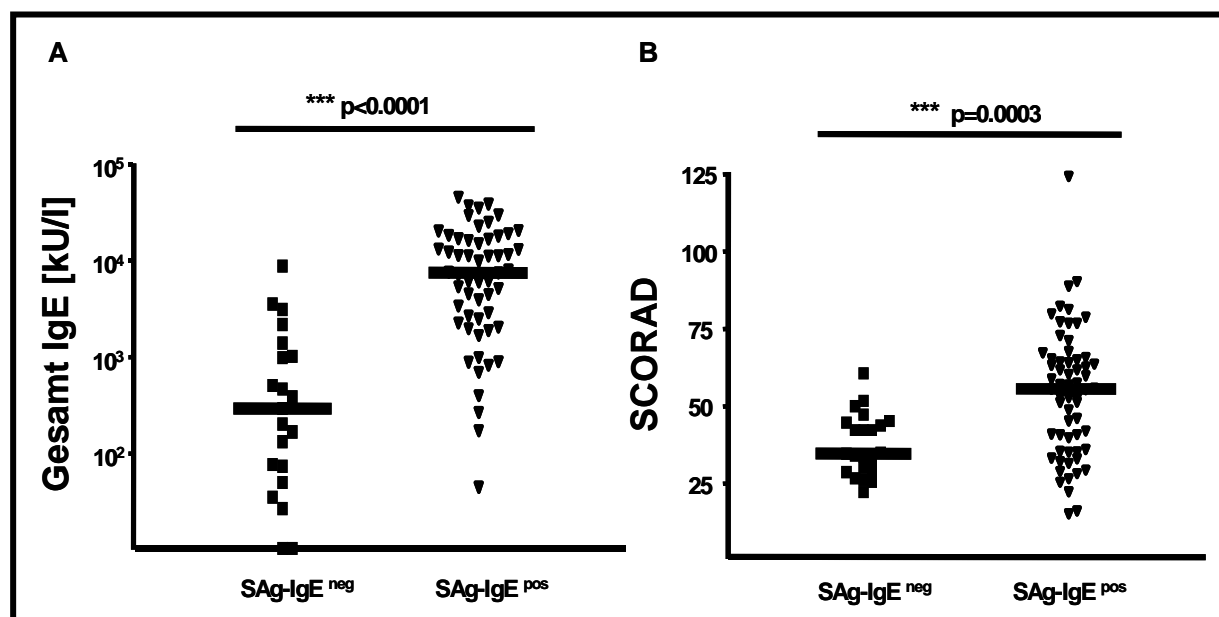


Abb.8: Serum Gesamt-IgE Spiegel (A) und Schweregrad des Ekzems (B) in Abhängigkeit der gegen Superantigene (SAg) sensibilisierten und nicht-sensibilisierten AD Patienten. Die Querbalken entsprechen den Medianwerten des Gesamt-IgE in kU/l bzw. den SCORAD Werten der jeweiligen Patientengruppe. Die statistische Analyse erfolgte nach dem zweiseitigen t-Test für ungepaarte Stichproben und ergab für beide Fälle eine deutliche Signifikanz.

3.2. Im Vergleich zum Kontrollkollektiv ist die adaptive Immunantwort bei einer Gruppe von AD Patienten verändert bzw. gestört

3.2.1. Patienten mit kutaner *S. aureus* Besiedlung weisen keine IgG-Subklassendefizienz auf

Auf die primäre Frage, ob die rezidivierende *S. aureus* Besiedlung aus einer möglichen IgG-Subklassendefizienz resultieren könnte, wurden die jeweiligen Isotypkonzentrationen in Abhängigkeit des bakteriellen Besiedlungsstatus betrachtet und mit denen der Kontrollen verglichen. Eine Defizienz war dabei für keine der Subklassen feststellbar, vielmehr wurden alle Isotypen in normalen Mengen analog zu den Kontrollen nachgewiesen. Ausnahmen bildeten jedoch die IgG1 und IgG4 Subklassen innerhalb der mit *S. aureus* besiedelten Patientengruppe; hier zeigten sich sogar signifikant erhöhte Konzentrationen im Vergleich zu den hautgesunden Probanden [Abb.9A-D].

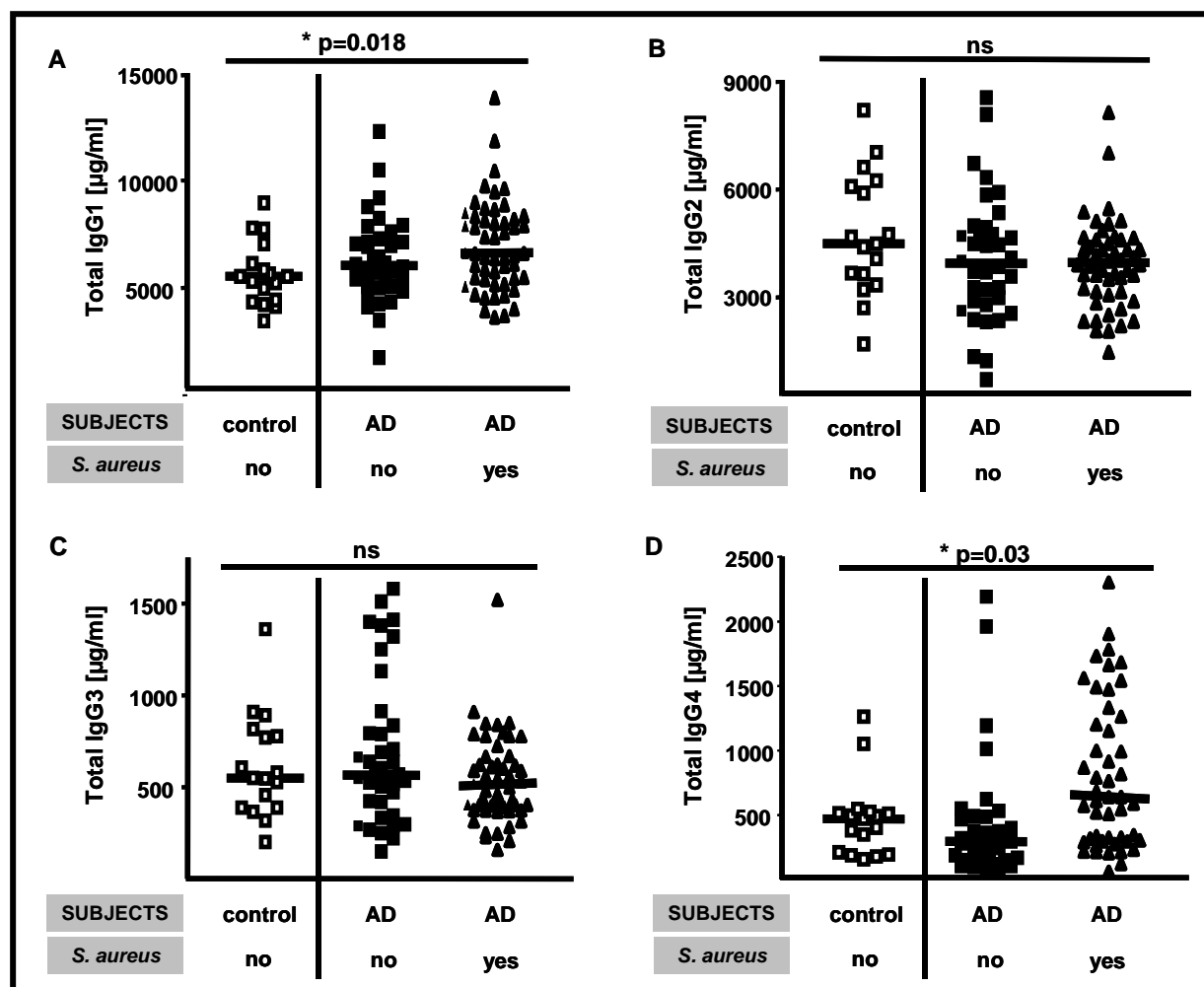


Abb.9: Konzentrationen der nephelometrisch bestimmten Gesamt IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) und IgG4 (D) Antikörper im Serum der Kontrollen und der Patienten mit und ohne *S. aureus* Besiedlung. Die Querbalken entsprechen den Medianen der jeweiligen Antikörperkonzentrationen in µg/ml. Die statistische Analyse erfolgte nach dem zweiseitigen Mann-Whitney *U*-Test für ungepaarte Stichproben und ergab für die IgG1 und IgG4 Subklasse der mit *S. aureus* besiedelten Patienten einen signifikanten Unterschied.

3.2.2. Fast die Hälfte der AD Patienten leidet unter einer IgG2 Defizienz gegenüber dem Staphylokokken Enterotoxin C1 (SEC1)

Da eine selektive IgG2 Defizienz ebenso bakterielle Infektionen bedingt, könnte eine beeinträchtigte Produktion Superantigen-spezifischer IgG2 Antikörper Ursache für eine mangelnde Protektion gegenüber den Toxinen sein. Zwar ist diese Subklasse primär gegen Polysaccharide gerichtet, kann aber auch Proteinantigene erkennen. Da SEC1 und SEB zu den meist identifizierten Toxinen in den Hautabstrichen zählten und zumindest gegen SEB am häufigsten das entsprechende Superantigen-spezifische IgE gebildet wurde, könnte dies mit einem selektiven IgG2 Defekt zusammenhängen. Tatsächlich

fehlten bei 38% der Patienten (30 von 78 Patienten) SEC1 spezifische IgG2 Antikörper, während lediglich vier der 28 hautgesunden Probanden (7%) von einer solchen Defizienz betroffen waren [Abb.10A]. Betrachtete man allerdings die Patienten unter dem Aspekt der *S. aureus* Besiedlung, so stellte sich heraus, dass das Fehlen von Antikörpern dieser Subklasse unabhängig davon auftrat. Somit fehlten nicht-besiedelten Patienten diese Antikörper gleichermaßen wie solchen, bei denen toxische Stämme nachweisbar waren. Dennoch war interessant, dass von den insgesamt 15 Patienten mit SEC1 Stämmen ein Drittel in die Gruppe der IgG2 defizienten Patienten fielen und wiederum 45% aller IgG2 defizienten Patienten gegen SEC1 sensibilisiert waren, was eine frühere Exposition mit diesem Superantigen voraussetzte. Im Gegensatz zum SEC1 ließ sich jedoch keine selektive Defizienz für IgG2 Antikörper gegen SEB beobachten. Diese Antikörper fehlten nur bei 10 AD Patienten, aber auch gleichzeitig bei sechs der hautgesunden Probanden [Abb.10B].

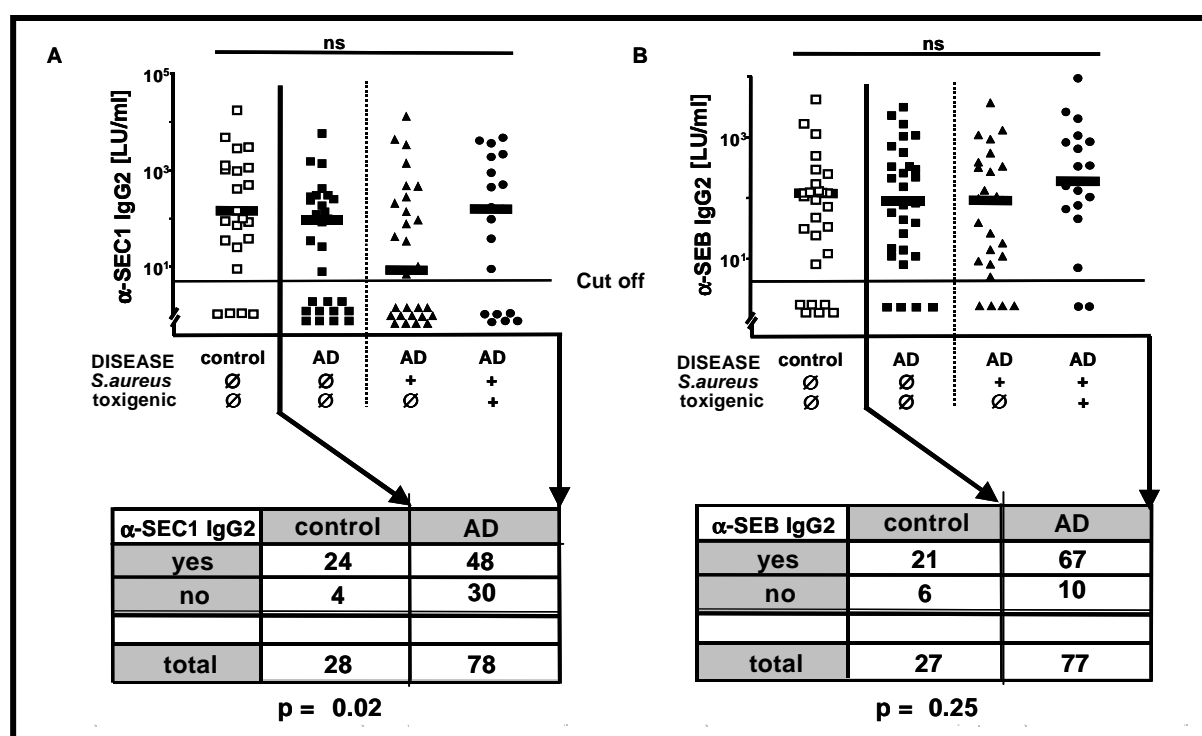


Abb.10: Konzentrationen der mittels ELISA bestimmten SEC1 (A) und SEB (B) spezifischen IgG2 Antikörper im Serum der hautgesunden Probanden und der AD Patienten mit unterschiedlichem *S. aureus* Besiedlungsstatus. Die Querbalken stehen für die Mediane der jeweiligen Antikörperkonzentrationen, die in LU/ml angegeben sind. Unterhalb des Grenzwertes (Cut offs) sind die Patienten ohne nachweisbare Antikörper dargestellt. „+“: vorhanden; „Ø“: nicht vorhanden; ns: nicht signifikant. Die Tabellen beziehen sich auf die Verteilung vorhandener bzw. fehlender SEC1/SEB spezifischer IgG2 Antikörper innerhalb der hautgesunden Probanden und der

AD Patienten. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigem χ^2 Test und ergab für die Untersuchung von α -SEC1 IgG2 eine Signifikanz mit $p < 0.05$ (*).

3.2.3. Die α -SEC1 IgG2 Defizienz beschränkt sich ausschließlich auf Superantigen-spezifische Antikörper der IgG2 Subklasse

Um festzustellen, inwiefern die Synthese weiterer SEC1 spezifischer IgG-Subklassen innerhalb der α -SEC1 IgG2 defizienten Patientengruppe beeinträchtigt war, wurden außerdem die entsprechenden IgG1 und IgG4 Serum-Titer mittels ELISA bestimmt. Zunächst zeigten fast alle hautgesunden Probanden diese Antikörper, was allerdings auch für die AD Patienten zutraf, und zwar unabhängig vom Vorhandensein bzw. vom Fehlen der SEC1 spezifischen IgG2 Antikörper. Im Unterschied zum IgG2 bestand somit keine selektive Defizienz in diesen Subklassen. Jedoch ergaben sich signifikant erhöhte IgG1 und IgG4 Antikörperkonzentrationen innerhalb der α -SEC1 IgG2 defizienten Patientengruppe im Vergleich zum Kontrollkollektiv [Abb.11A,B].

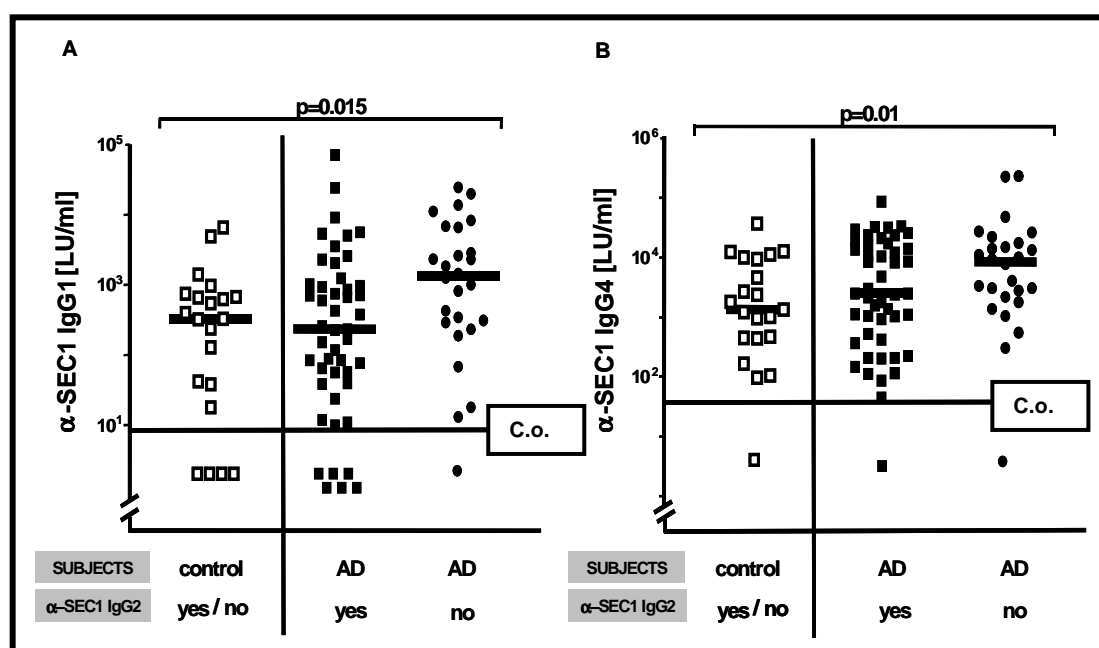


Abb.11: Konzentrationen der SEC1 spezifischen IgG1 (A) und IgG4 (B) Antikörper im Serum der hautgesunden Probanden und der AD Patienten mit und ohne α -SEC1 IgG2 Defizienz. Die Querbalken stehen für die Mediane der jeweiligen Antikörperkonzentrationen in LU/ml. Unterhalb des Cut offs (C.o.) sind die Patienten ohne nachweisbare Antikörper dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte nach dem zweiseitigen Mann-Whitney *U*-Test für ungepaarte Stichproben und ergab für die Untersuchung der α -SEC1 IgG2 defizienten Patienten eine signifikante Differenz mit $p < 0.05$ (*).

3.2.4. Die α -SEC1 IgG2 defizienten Patienten zeigen eine unbeeinträchtigte Synthese anderer antigenspezifischer IgG2 Antikörper

Da auf Ebene der Superantigen-spezifischen IgG-Subklassen eine selektive Defizienz innerhalb der IgG2 Antikörper bestand, musste überprüft werden, inwiefern dies auch für andere bakterielle Antigene zutraf. Als klassisches Beispiel hierfür galt das Pneumokokken-Kapsel-Polysaccharid (PCP), gegen das typischerweise IgG2 Antikörper gebildet werden. Die serologische Untersuchung mittels ELISA ergab miteinander vergleichbare anti-PCP IgG2 Titer im Kontrollkollektiv und bei den Patienten. Auch in der α -SEC1 IgG2 defizienten Patientengruppe waren anti-PCP IgG2 Antikörper im gleichen Maße nachweisbar [Abb.12].

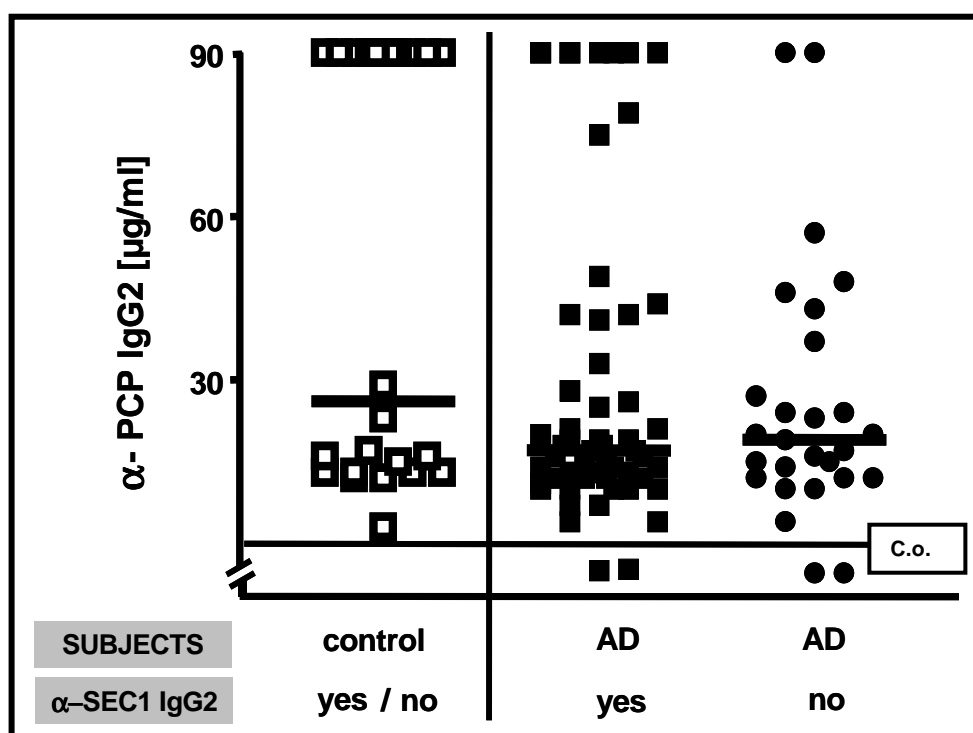


Abb.12: Serologische Konzentrationsbestimmung PCP spezifischer IgG2 Antikörper bei hautgesunden Probanden und AD Patienten mit und ohne α -SEC1 IgG2 Defizienz. Die Querbalken geben die Mediane der jeweiligen Antikörperkonzentrationen in μ g/ml an. Unterhalb des Cut offs (C.o.) sind die Patienten ohne nachweisbare Antikörper dargestellt.

3.2.5. Patienten ohne SEC1 spezifische IgG2 Antikörper besitzen eine normale Kapazität zur Bildung aller IgG-Subklassen

Zur weiteren Charakterisierung der Patienten mit α -SEC1 IgG2 Defizienz wurden die Gesamt-Titer der IgG-Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 herangezogen, um einen generellen Defekt diesbezüglich auszuschließen. Erneut gab es keinen Konzentrations-

unterschied zwischen den Kontrollen und den AD Patienten mit Ausnahme der IgG1 Subklasse, die bei den Patienten ohne SEC1 spezifische IgG2 Antikörper verglichen mit den Kontrollen signifikant erhöht war [Abb.13A-D]. Hiermit wurde der Aspekt der Selektivität der IgG2 Defizienz gegenüber Superantigenen bei ansonsten normaler IgG2 Synthese deutlich.

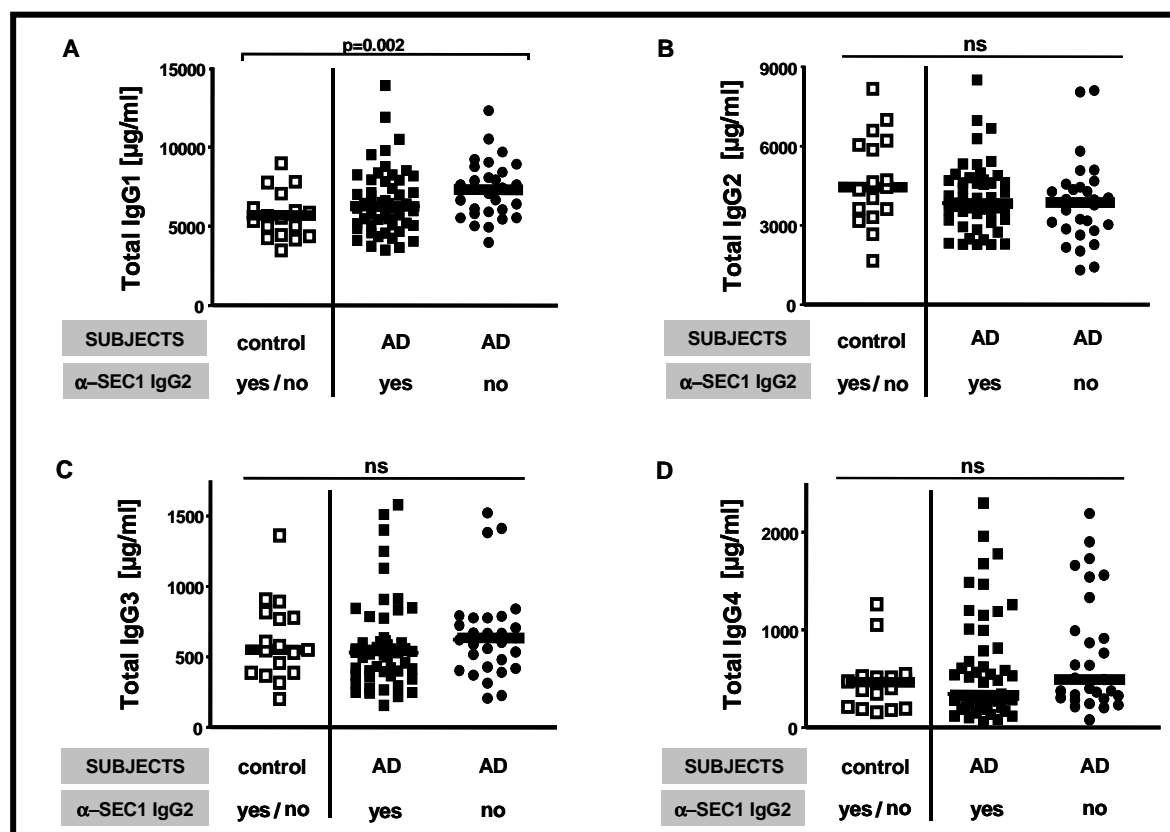


Abb.13: Konzentrationen der nephelometrisch bestimmten Gesamt IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) und IgG4 (D) Antikörper im Serum der Kontrollen und der Patienten mit und ohne α -SEC1 IgG2 Defizienz. Die statistische Analyse erfolgte nach dem zweiseitigen Mann-Whitney *U*-Test für ungepaarte Stichproben und ergab für die IgG1 Subklasse der α -SEC1 IgG2 defizienten Patienten eine Signifikanz mit $p < 0.01(**)$.

3.2.6. Patienten mit α -SEC1 IgG2 Defizienz reagieren nach SEC1 Restimulation der PBMCs mit einer T_H2 -Antwort und leiden unter einem mittelschweren bis schweren Ekzem

Um das Phänomen der selektiven IgG2 Defizienz ansatzweise zu klären, wurde auf eine Regulationsstörung hinsichtlich eines präferentiellen T_H2 -Zytokinprofils untersucht, welches an der Inhibition der IgG2 Synthese beteiligt sein könnte. PBMCs der Patienten, denen SEC1 spezifische IgG2 Antikörper fehlten, sezernierten dabei auffälligerweise IL-4 und IL-5 nach SEC1 Restimulation, während Patienten ohne eine solche IgG2 Defizienz

nicht zur Sekretion dieser Zytokine imstande waren [Abb.14]. Dieses unterschiedliche Sekretionsprofil trat allerdings nicht nach Restimulation mit SEB, Lipoteichonsäure oder Peptidoglycan auf.

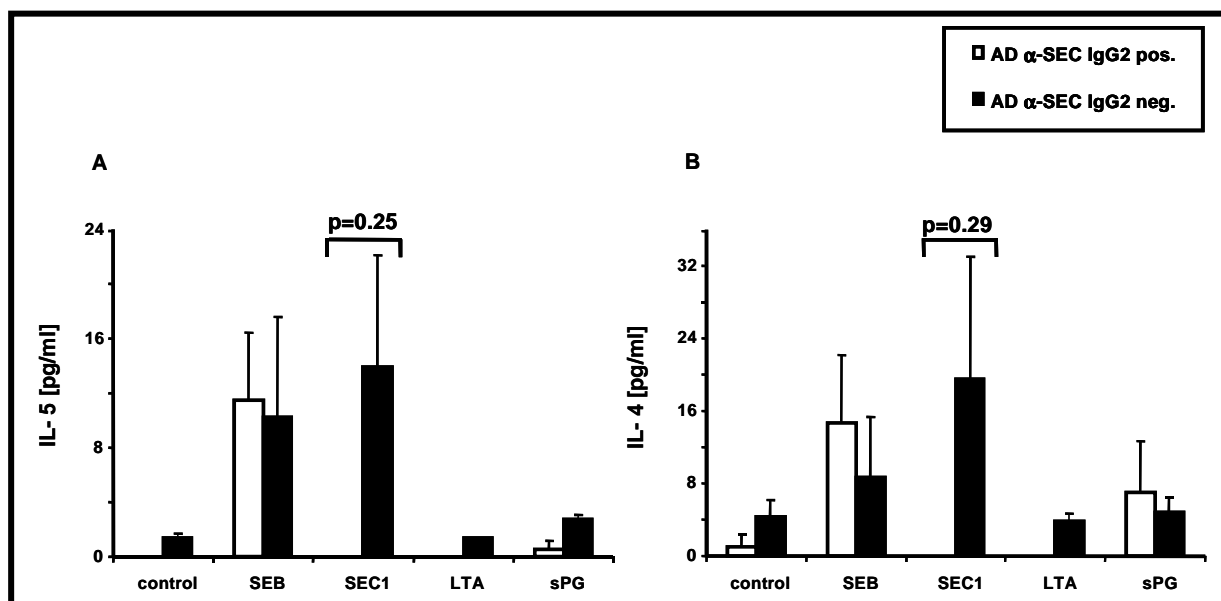


Abb.14: Konzentrationen von IL-5 (A) und IL-4 (B) in den Kulturüberständen der für 24 Stunden stimulierten PBMCs von Patienten mit (n=4) und ohne α-SEC1 IgG2 Defizienz (n=4). 3×10^5 Zellen/200 µl wurden mit hochaufgereinigtem SEB und SEC1 [100 pg/ml] sowie mit Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglycan (sPG) [1 µg/ml] stimuliert bzw. blieben zur Kontrolle unstimuliert (control). Anschließend wurden die Zytokine mittels CBA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte einschließlich der Standardabweichungen zu jeder Patientengruppe.

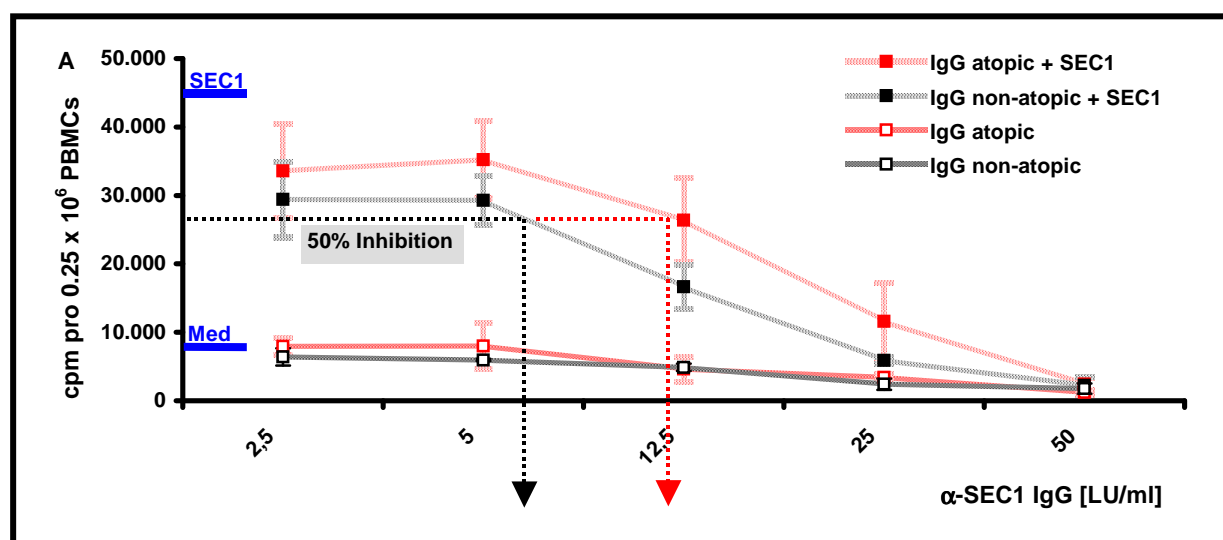
Außerdem fiel auf, dass mehr als zwei Drittel der α-SEC1 IgG2 defizienten Patienten unter einem mittelschweren bis schweren Ekzem litten (SCORAD > 40 Punkte), während fast zwei Drittel der Patienten mit SEC1 spezifischen IgG2 Antikörpern eine leichte bis mittelschwere Verlaufsform der Erkrankung zeigten (SCORAD < 40 Punkte) [Tab.16].

Tab.16: Zusammenhangsanalyse zwischen der Präsenz bzw. dem Fehlen antigenspezifischer IgG2 Antikörper und dem Schweregrad der Erkrankung nach dem χ^2 Test. In einigen Fällen fehlten die SCORAD Werte, so dass nicht alle Patienten hier berücksichtigt wurden.

IgG2 antibodies against		SCORAD		p-value
		< 40 pts	> 40 pts	
SEC1	yes	28	20	0.01 (*)
	no	9	21	
SEB	yes	38	28	0.60
	no	3	6	
PCP	yes	30	47	0.66
	no	2	2	

3.2.7. Die Neutralisierung einer SEC1 induzierten T-Zellantwort durch IgG Antikörper der Patienten ist im Vergleich zu der der Kontrollen deutlich erschwert

Auch eine beeinträchtigte Funktion Superantigen-spezifischer IgG Antikörper könnte die mangelnde Protektion gegenüber den Toxinen erklären. Um dies zu untersuchen, wurden PBMCs eines hautgesunden Spenders mit unterschiedlichen Volumina der aus Patientenseren aufgereinigten IgG Antikörper in Anwesenheit von SEC1 bzw. SEB inkubiert, wobei entsprechende Konzentrationen der jeweiligen Toxin spezifischen IgG Antikörper enthalten waren (s. Material und Methodenteil Abschnitt 2.2.7). Parallel dazu wurden gleiche Ansätze mit den aus Kontrollseren aufgereinigten IgG Antikörpern untersucht. Während der alleinige Zusatz der Antikörper keine T-Zellproliferation induzierte, wurde diese im Beisein des Toxins und mit zunehmender Antikörperkonzentration inhibiert. Im Vergleich zu den hautgesunden Probanden zeigte sich jedoch, dass zum Erreichen einer 50%-igen Inhibition der SEC1 induzierten T-Zellantwort die doppelte Antikörpermenge der Patienten erforderlich war (Kontrolle: ~5 LU/ml *versus* AD: ~12.5 LU/ml) [Abb.15A]. Dahingegen wurde eine 50%-ige Inhibition der SEB induzierten T-Zellantwort bei einer gleichen Antikörperkonzentration sowohl der Patienten als auch der Kontrollen erzielt (Kontrolle/AD: ~5 LU/ml) [Abb.15B]. Somit besaßen SEB spezifische Antikörper der Patienten eine gleichermaßen neutralisierende Wirkung wie die der Kontrollen, während die SEC1 spezifischen IgG Antikörper weniger effizient waren.



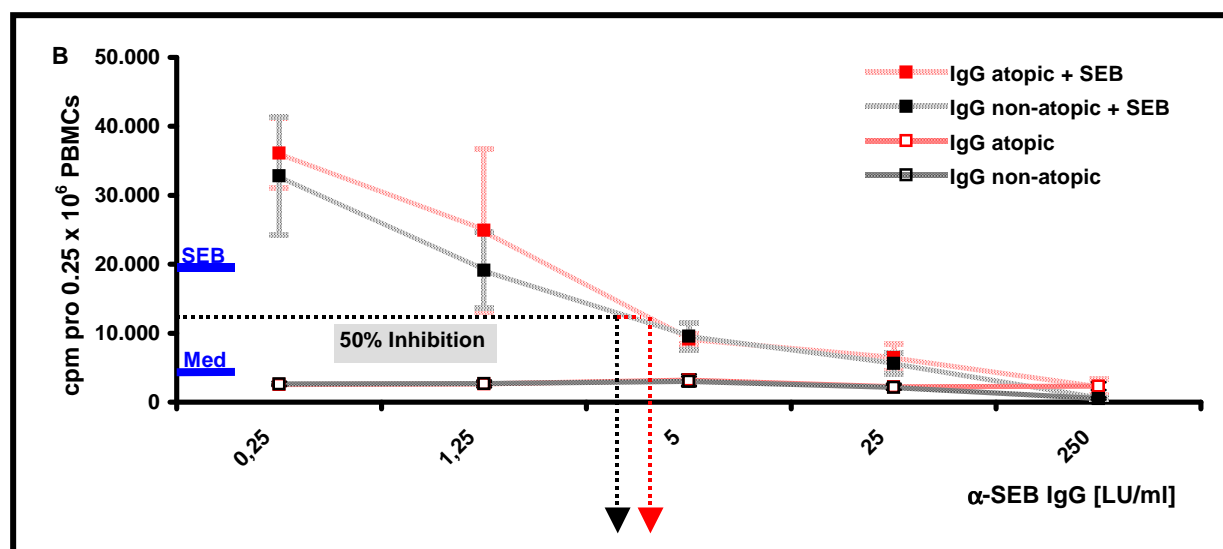


Abb.15: Inhibition der SEC1 (A) und SEB (B) induzierten T-Zellantwort durch aufgereinigte IgG Antikörper der Patienten und der hautgesunden Probanden. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen der eingesetzten Antikörper zu den angegebenen Konzentrationen (AD: α -SEB IgG n=4 und α -SEC1 IgG n=5; Kontrollen: n=4). Gemessen wurde die Proliferation der $[^3\text{H}]$ Thymidin eingebauten Radioaktivität in cpm bezogen auf 0.25×10^6 PBMCs. Ebenso angezeigt sind die Werte nach alleiniger Stimulation mit SEC1 bzw. SEB [10 pg/ml], bei Erreichen der 50%-igen Inhibition sowie im unstimulierten Zustand (Med).

3.3. Das häufige Auftreten der heterozygoten TLR-2 R753Q Mutation in der atopischen Dermatitis & die mögliche funktionelle Relevanz

3.3.1. AD Patienten tragen vermehrt bekannte TLR-2/4 SNPs im Vergleich zu den Kontrollen

Um festzustellen, inwiefern die rezidivierende *S. aureus* Besiedlung in der atopischen Dermatitis mit einer gestörten Pathogenabwehr auf Seiten des angeborenen Immunsystems zusammenhing, wurden die Patienten hinsichtlich in der Literatur beschriebener TLR-2 und TLR-4 Punktmutationen untersucht, die entweder eine beeinträchtigte Signaltransduktion oder eine verminderte Pathogenerkennung zur Folge haben. Hierfür kamen die innerhalb der TIR-Domäne des TLR-2 auftretenden R753Q und R677W SNPs in Frage, die aufgrund des jeweiligen Aminosäureaustauschs nicht nur die Signaltransduktion beeinträchtigen, sondern darüber hinaus im Fall von R753Q mit einer erhöhten *S. aureus* Infektion⁽⁹⁵⁾ und im Fall von R677W mit einer erhöhten mykobakteriellen Infektion assoziiert wurden.⁽¹⁰⁵⁾ Auch die in der extrazellulären Domäne des TLR-4 auftretenden und cosegregierenden D299G/T399I SNPs bedingen durch den jeweiligen Aminosäureaustausch eine verminderte Pathogenerkennung und somit eine

vermehrte Infektion mit gram-negativen Bakterien.⁽¹⁰⁶⁾ Wie in Abbildung 16 dargestellt, konnten mit den Genotypisierungen innerhalb der AD Patienten 11.5% (9 von 78) als Träger des heterozygoten TLR-2 R753Q SNPs und weitere 12% der Patienten (9 von 76) als Träger der heterozygoten und cosegregierenden TLR-4 SNPs identifiziert werden. Interessanterweise traten die TLR-2 und TLR-4 SNPs bei keinem Patienten gleichzeitig auf, während die Prävalenz dieser Mutationen innerhalb des Kontrollkollektivs in beiden Fällen bei 2.5% (1 von 39) lag. Fasste man nun die Patienten mit den TLR-2 und TLR-4 SNPs zusammen, so ergab sich sogar eine signifikant höhere Inzidenz für das Auftreten dieser Mutationen im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Im Gegensatz dazu war der TLR-2 R677W SNP weder bei den Patienten noch bei den hautgesunden Probanden nachweisbar.

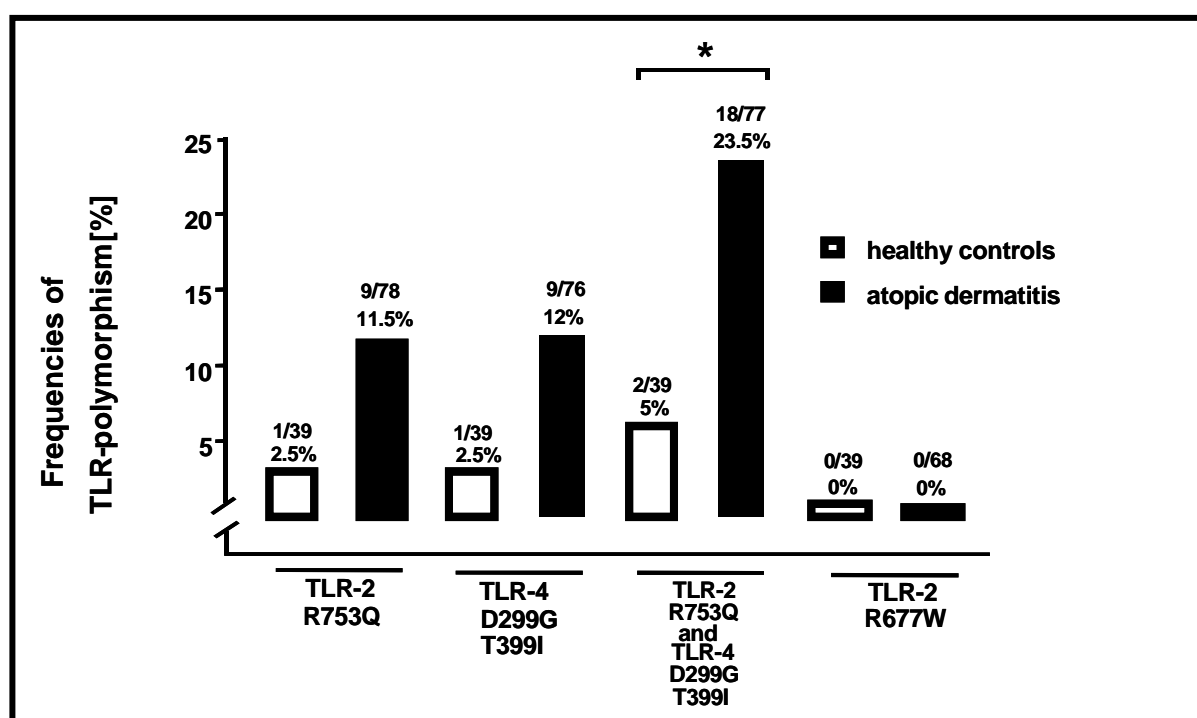


Abb.16: Häufigkeit der bekannten TLR-2 und TLR-4 SNPs bei Patienten mit atopischer Dermatitis und hautgesunden Probanden. Die statistische Zusammenhangsanalyse erfolgte nach dem zweiseitigen χ^2 Test und ergab für die Untersuchung der TLR-2 und TLR-4 polymorphen AD Patienten eine einfache Signifikanz mit $p=0.01$ (*).

3.3.2. AD Patienten mit der heterozygoten TLR-2 R753Q Mutation zeigen ein partielles Risiko zur kutanen *S. aureus* Besiedlung

Die Korrelation zwischen der Präsenz der TLR-2/4 Mutationen und dem Besiedlungsstatus mit *S. aureus* ergab, dass 10% der nicht mit *S. aureus* besiedelten

Patienten in die Gruppe der Mutationsträger fielen, während 13% der mit *S. aureus* besiedelten Patienten TLR-2/4 polymorph waren. Eine Prädominanz des heterozygoten TLR-2 R753Q SNPs bei gleichzeitiger *S. aureus* Besiedlung lag jedoch nicht vor. Stattdessen zeigten sowohl TLR-2 als auch TLR-4 polymorphe Patienten zu je 6.5% eine Staphylokokken-Besiedlung [Abb.17].

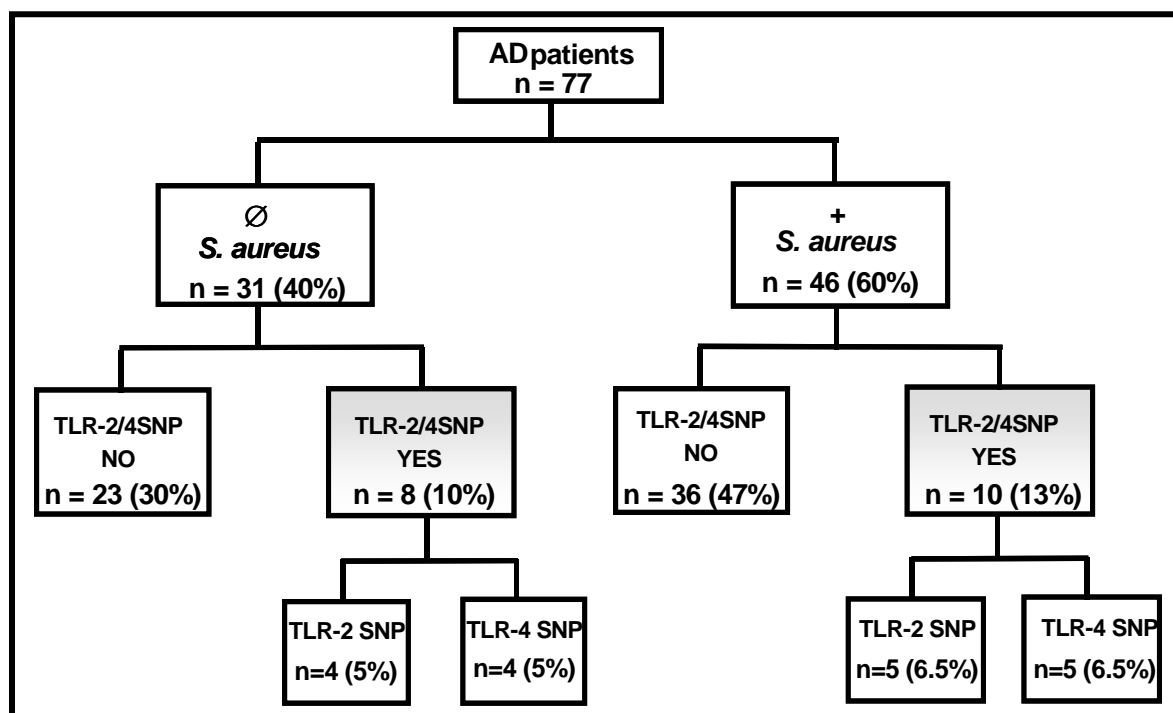


Abb.17: Verteilung der TLR-2 R753Q und TLR-4 D299G/T399I SNPs auf AD Patienten hinsichtlich des Besiedlungsstatus mit *S. aureus*.

3.3.3. Die heterozygote TLR-2 R753Q Mutation geht mit einer schweren Verlaufsform der atopischen Dermatitis einher

Patienten der heterozygoten TLR-2 R753Q Mutation zeigten dennoch einen besonderen Phänotyp, der durch ein schweres Ekzem charakterisiert war (Median SCORAD: 56 Punkte im Bereich von 30 bis 90.5 Punkten). Im Gegensatz dazu lag ein mittelschweres Ekzem bei den nicht-polymorphen Patienten (Median SCORAD: 45 Punkte mit 15-89 Punkten als Min-Max Werte) sowie bei den Mutationsträgern der heterozygoten TLR-4 SNPs (Median SCORAD: 40 Punkte im Bereich von 21 bis 61 Punkten) vor. Außerdem wurden die höchsten Gesamt-IgE Titer bei allen Patienten mit dem TLR-2 SNP detektiert (Median: 15.587 kU/l im Bereich von 787 bis 84.778 kU/l). Hiernach folgten die nicht-polymorphen Patienten (Median: 3.215 kU/l im Bereich von 10 bis 43.838 kU/l) und schließlich die Patienten mit den TLR-4 SNPs (Median: 854 kU/l im Bereich von 10 bis 4.341 kU/l) [Abb.18A]. Gleiches zeigte sich auch für Superantigen-spezifisches und

Hausstaubmilben-(Der p) spezifisches IgE [Abb.18B,C]. So konnten für den zuletzt genannten Parameter die höchsten IgE-Titer in der TLR-2 polymorphen AD Gruppe verzeichnet werden (Median: 100 kU/l), gefolgt von den Patienten mit dem TLR-2 Wildtypgen (Median: 12.25 kU/l) und schließlich von den Patienten mit den TLR-4 SNPs (Median: 1.9 kU/l).

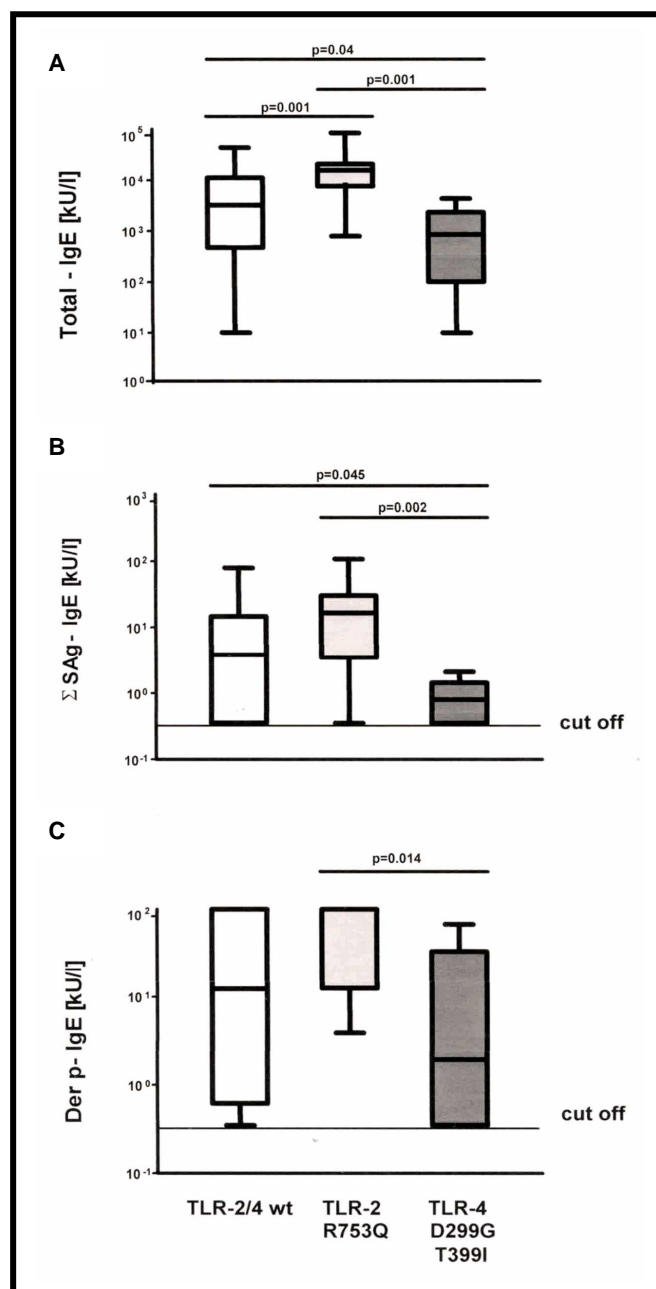


Abb.18: Konzentrationen des Gesamt-IgE (A), des Superantigen-spezifischen (B) und des anti-Der p IgE (C) im Serum der AD Patienten abhängig vom Fehlen bzw. Vorhandensein der TLR-2 und TLR-4 SNPs. Insgesamt waren n=60 Patienten Träger des Wildtypgens (wt) für TLR-2 bzw. TLR-4, während n=9 Patienten heterozygot für den TLR-2 SNP und weitere n=9 Patienten heterozygot für die TLR-4 SNPs waren. Die Werte der SEA, SEB, SEC, SED und TSST-1 spezifischen IgE Titer wurden addiert und als Summe dargestellt. Das Detektionslimit der zu erfassenden antigenspezifischen IgE Antikörper lag bei 0.35 kU/l. Zu jeder Patienten-gruppe waren die Min-Max Werte sowie das erste Quartil, Median und das dritte Quartil angegeben. Die statistische Signifikanz wurde nach dem zweiseitigen Mann-Whitney U-Test ermittelt.

3.3.4. Die LTA vermittelte Antwort ist in-vitro abhängig von der Dosis des Wildtyp bzw. mutierten R753Q TLR-2 Konstrukts

Durch Transfektion von HEK293 Zellen mit einem 50:50 Gemisch aus mutiertem und Wildtyp TLR-2 Konstrukt sollte die heterozygote Situation in-vitro simuliert werden. Zuvor

musste jedoch überprüft werden, inwiefern tatsächlich eine Abhängigkeit zwischen dem Stimulationsgrad und der Menge an verfügbarem Rezeptor bestand. Durch Transfektion unterschiedlicher TLR-2 Konstruktmenngen bei einheitlicher LTA-Stimulation zeigte sich mit zunehmender Expression des Rezeptors ein linearer Anstieg an aktiviertem NF κ B. In ähnlicher Weise verhielt sich auch das mutierte R753Q Konstrukt, mit dem Unterschied, dass die Expressionstärken bis zur Hälfte schwächer ausfielen. Dennoch verfügte diese Mutante noch über eine höhere Aktivität als die TLR-2 Kontrollmutante P681H, die allerdings auch keine Dosisabhängigkeit zeigte. Im Gegensatz dazu reagierten TLR-9 Transfektanten über den gesamten Konzentrationsbereich des Rezeptors nicht auf LTA [Abb.19].

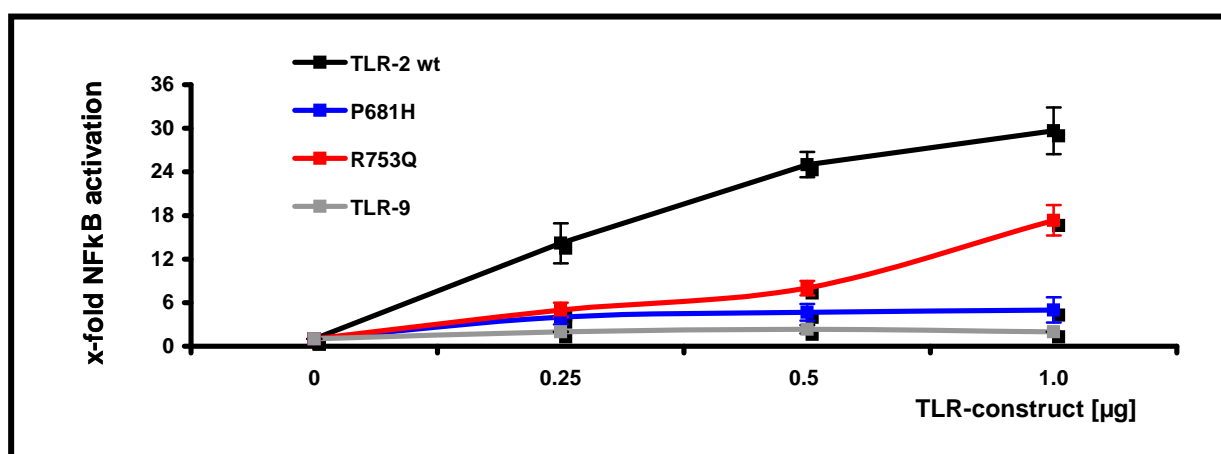


Abb.19: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen den TLR-Konstrukten und der NF κ B Antwort. HEK293 Zellen wurden mit den angegebenen Mengen an TLR-Konstrukten zusammen mit je 0.25 μ g NF κ B Reporter für 48 Stunden cotransfiziert und dann für 48 Stunden mit LTA [30 μ g/ml] stimuliert. Dargestellt sind die Induktionsfaktoren als x-fache NF κ B Aktivität zu den jeweiligen untransfizierten Ansätzen aus insgesamt drei unabhängigen Transfektionen.

3.3.5. Die NF κ B Antwort der homozygoten und heterozygoten R753Q Mutante ist abhängig vom TLR-2 Stimulus

Aufgrund der Dosisabhängigkeit der TLR-2 Antwort war nun auch die in-vitro Charakterisierung der heterozygoten TLR-2 R753Q Mutation möglich, die schließlich die Patientensituation reflektierte. Analog zum vorherigen Experiment führte die alleinige Expression von 1 μ g transfiziertem R753Q Konstrukt nach LTA-Stimulation noch zu einer 50%-igen NF κ B Antwort. Dahingegen wurde deutlich, dass durch Heterodimerisierung des mutierten Konstrukts mit dem endogenen TLR-1 bzw. mit dem kotransfizierten TLR-6 die NF κ B Antwort weniger beeinträchtigt war. So war die durch TLR-2/1 vermittelte Pam3Cys Antwort noch zu 60% und die durch TLR-2/6 vermittelte MALP-2 Antwort sogar noch zu

90% nachzuweisen. Umgekehrt jedoch konnte durch Transfektion von 50% TLR-2 Wildtyp-Konstrukt (0.5 µg) keine 100%-ige Antwort mehr erzielt werden. Selbst die Interaktion mit TLR-9 hatte keine unspezifische Rezeptor-getriggerte Aktivierung zur Folge (s. Material und Methodenteil Abschnitt 2.3.9.). Der Vergleich zu den mit MALP-2 stimulierten homozygoten Ansätzen machte sogar deutlich, dass die geringere TLR-2 Rezeptordichte für eine vollständige Aktivierung nicht ausreichte. Lag aber ein 50:50 Gemisch aus Wildtyp und mutiertem Konstrukt vor, so konnte aufgrund der Residualaktivität des R753Q Konstrukts zu einer 100%-igen NFκB Antwort verholfen werden, allerdings nicht im Fall von nur über TLR-2 vermittelnden Liganden (LTA) [Abb.20A]. Hinsichtlich der funktionellen Bedeutung der R753Q Mutation stellte sich durch Vergleich mit der Kontrollmutante P681H heraus, dass es nur im homozygoten Zustand Unterschiede gab. So lag die Residualaktivität des P681H Konstrukts mit 35% bis 54% weitaus niedriger als bei der R753Q Mutante [Abb.20B].

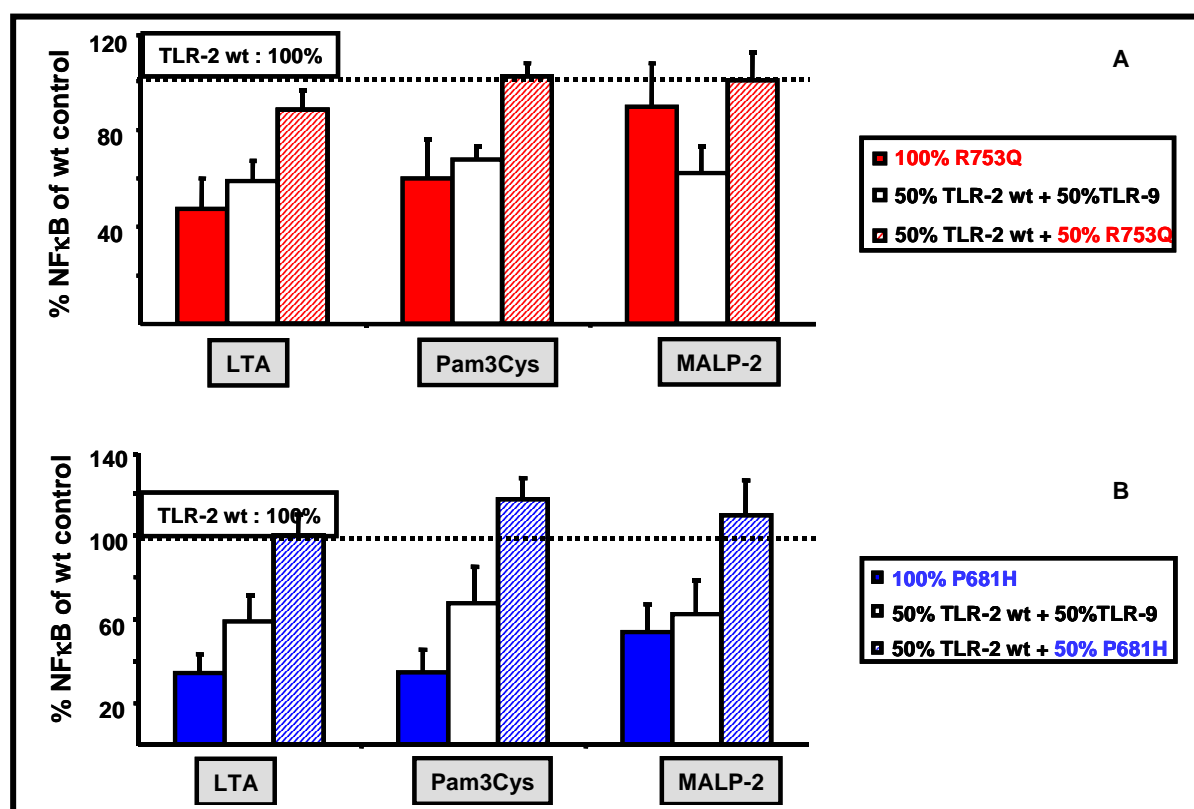


Abb.20: Effekte der homozygoten und heterozygoten R753Q (A) sowie P681H (B) SNPs auf die NFκB Antwort in Abhängigkeit verschiedener TLR-2 Liganden. HEK293 Zellen wurden entweder mit 1 µg TLR-2 Wildtyp (wt) Konstrukt (100% wt) oder mit 0.5 µg TLR-2 Wildtyp (wt) Konstrukt zusammen mit 0.5 µg R753Q/P681H bzw. mit 0.5 µg TLR-9 (50% wt + 50% mt bzw. 50% TLR-9) transfiziert, wodurch die heterozygote Mutation simuliert wurde. Transfektanten mit 1 µg mutiertem (mt) Konstrukt gaben die homozygote Situation (100% mt) wieder. In allen Fällen erfolgte eine

Kotransfektion mit 0.5 µg TLR-6 sowie mit 0.25 µg NFκB Reporter. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 48 Stunden mit LTA [30 µg/ml]; Pam3Cys [30 µg/ml] und MALP-2 [0.3 µg/ml] stimuliert. Hiernach folgte die Messung der NFκB Aktivität, die prozentual zur jeweils gleich stimulierten und als 100% definierten Wildtyp-Situation (punktierte Linie) angegeben ist. Dargestellt sind die Mittelwerte aus insgesamt n=8 unabhängigen Transfektionsansätzen ± der Standardabweichungen.

3.3.6. Die heterozygote TLR-2 R753Q Mutante hat eine verminderte IL-8 Sekretion zur Folge

Um die Auswirkung der heterozygoten R753Q Mutation auf Effektorebene zu analysieren, wurde IL-8 in den Kulturüberständen derselben Transfektanten bestimmt, die bereits für die NFκB Messung eingesetzt wurden [Abb.21A,B]. IL-8 vermittelt die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und spielt somit eine wichtige Rolle in der Regulation des Entzündungsgeschehens. In Diskrepanz zu den NFκB Daten war die IL-8 Sekretion nicht nur bei der homozygoten, sondern auch bei der heterozygoten Mutation unabhängig vom TLR-2 Liganden und im Vergleich zu der Wildtyp-Situation bis zu 20% beeinträchtigt. Ähnlich verhielt sich auch die P681H Kontrollmutante. Selbst auf homozygoter Ebene war die IL-8 Sekretion durch beide Mutationen stärker betroffen. So konnten homozygote R753Q Transfektanten nur noch 30% bis 60% IL-8 sezernieren, während homozygote P681H Transfektanten sogar nur maximal 30% IL-8 bilden konnten.

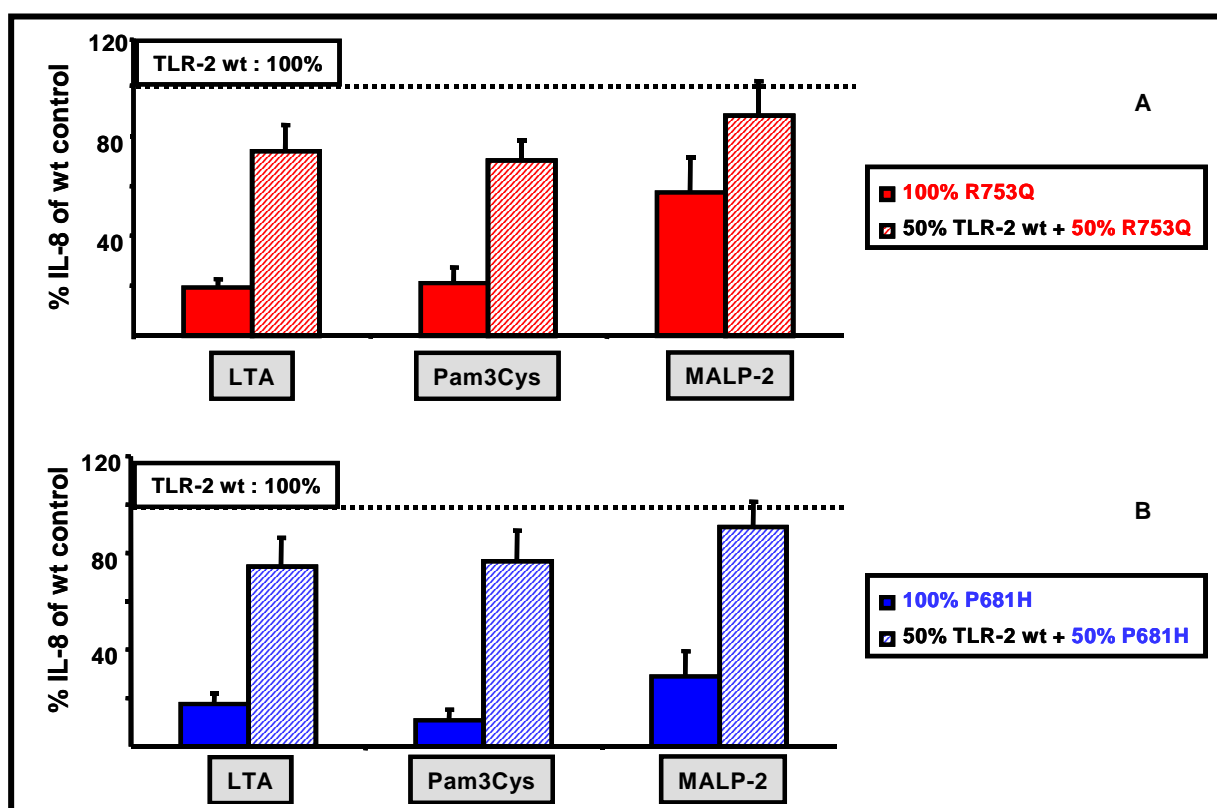


Abb.21: Effekte der homozygoten und heterozygoten R753Q (A) sowie P681H (B) SNPs auf die IL-8 Sekretion in Abhängigkeit verschiedener TLR-2 Liganden. In den Kulturüberständen der in Abbildung 20 beschriebenen Transfektionsansätze wurde das sezernierte IL-8 mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist die prozentuale IL-8 Produktion bezogen auf die jeweils gleich stimulierte Wildtyp-Situation, welche als 100% definiert ist (punktierter Linie). Dargestellt sind die Mittelwerte aus insgesamt n=8 unabhängigen Transfektionsansätzen \pm der Standardabweichungen.

3.3.7. Die IP-10 Produktion bleibt von der heterozygoten TLR-2 R753Q Mutation unbeeinflusst

Zur weiteren in-vitro Charakterisierung der R753Q Mutante wurde auch das Chemokin IP-10 als Effektormolekül herangezogen [Abb.22A,B], welches die Rekrutierung von T_H1-Zellen vermittelt und somit bei der T_H1/T_H2 Antwort von Bedeutung ist. Hier stimmte das Ergebnis im Prinzip mit dem von NF κ B aus Abschnitt 3.3.5. überein. Der einzige Unterschied bestand bei der MALP-2 Stimulation, wo nicht nur die homozygoten Transfektanten zur vollen IP-10 Produktion imstande waren und sich wie die heterozygoten Transfektanten verhielten, sondern in beiden Fällen sogar eher zu einer Verstärkung beitrugen. An diesem Beispiel wurde deutlich, dass die Erkennung von zweifach acetylierten Lipoproteinen weniger die Präsenz eines funktionellen TLR-2 erforderte, als es für dreifach acetylierte Lipoproteine (Pam3Cys) der Fall ist. Bezüglich der Kontrollmutante P681H konnten für MALP-2 jedoch nicht die gleichen Beobachtungen gemacht werden; hier waren die IP-10 Daten gänzlich den NF κ B Daten analog.

3.3.8. Die durch *S. aureus* vermittelte IL-8 Antwort ist bei der heterozygoten TLR-2 R753Q Mutation deutlich reduziert

Zu den abschließenden Untersuchungen zählte die Stimulation der homozygoten und heterozygoten R753Q Transfektanten mit hitzeinaktivierten *S. aureus* Keimen, um neben den deskriptiven Untersuchungen aus Abschnitt 3.3.2. den tatsächlichen Bezug zwischen der Mutation und Staphylokokken anhand von NF κ B, IL-8 und IP-10 zu analysieren [Abb.23]. Wieder zeigte sich für NF κ B und IP-10 ein gleiches Bild, nämlich eine 30% bis 50% reduzierte Antwort im homozygoten und eine normale Antwort im heterozygoten System. Dies galt jedoch nicht für IL-8, auf das die heterozygoten R753Q Transfektanten nur zu 60% reagierten.

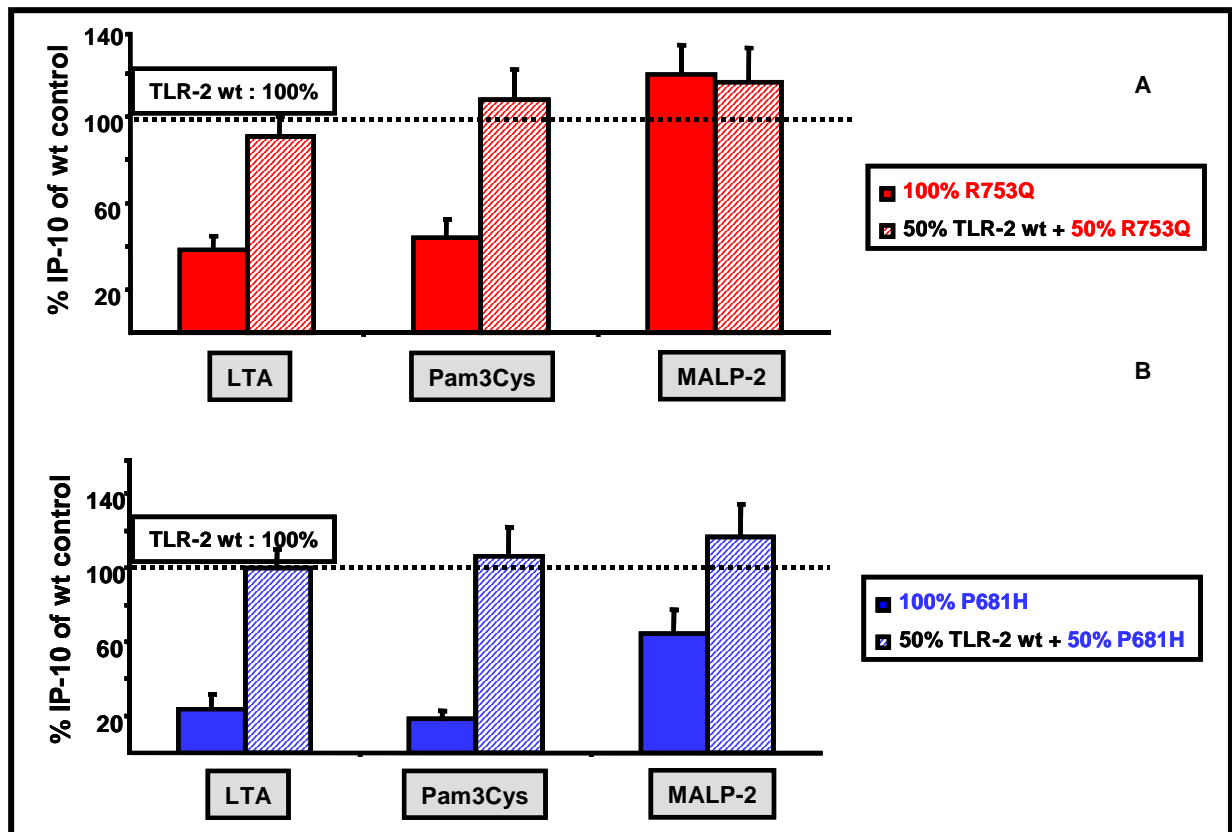


Abb.22: Einfluss der homozygoten und heterozygoten R753Q (A) sowie P681H (B) SNPs auf die IP-10 Sekretion in Abhängigkeit verschiedener TLR-2 Liganden. In den Kulturüberständen der in Abbildung 20 beschriebenen Transfektionsansätze wurde das sezernierte IP-10 mittels ELISA bestimmt, welches prozentual zur jeweils gleich stimulierten Wildtyp-Situation (100%: punktierte Linie) angegeben ist. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm der Standardabweichungen.

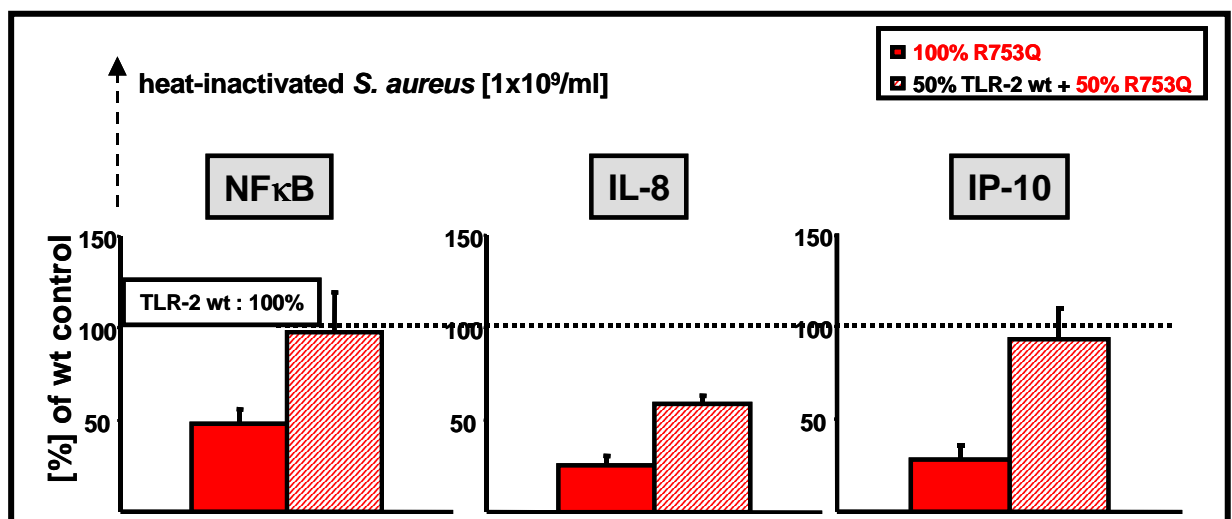


Abb.23: Effekte der homozygoten und heterozygoten R753Q Mutation auf die NFκB, IL-8 und IP-10 Antwort nach *S. aureus* Stimulation. Dargestellt sind die zur Wildtyp-Situation prozentual errechneten Mittelwerte aus einer 8-fach Bestimmung \pm der Standardabweichungen.

3.4. Staphylogene Komponenten können direkt mit T-Zellen über TLR-2 interagieren

3.4.1. CD4⁺ T-Zellen exprimieren TLR-2 nach vollständiger T-Zellaktivierung

Auf die Frage, ob staphylogene Komponenten direkt über einen TLR-2 vermittelten Mechanismus auf T-Zellen wirken und somit die lokale Entzündung als auch die Prägung der T_H1/T_H2 Antwort beeinflussen können, setzte den Nachweis dieses Rezeptors auf T-Zellen voraus. Mittels durchflusszytometrischer Untersuchung von CD4⁺ T-Zellen aus PBMCs nicht-atopischer Spender konnte zunächst eine Kontamination mit Monozyten aufgrund einer fehlenden CD3 negativen Population ausgeschlossen werden. Ohne vorherige Aktivierung der T-Zellen, d.h. direkt nach Aufreinigung, zeigten diese keine TLR-2 Expression. Erst durch vollständige T-Zellaktivierung in Anwesenheit von α CD3 und α CD28 Antikörpern konnte TLR-2 deutlich auf der Oberfläche von T-Zellen nachgewiesen werden [Abb.24].

3.4.2. Die TLR-2 Expression ist restringiert auf aktivierten T-Zellen des Memory-Phänotyps

Zur weiteren Charakterisierung der TLR-2 positiven CD4⁺ T-Zellpopulation folgten Doppelfärbungen mit Antikörpern für TLR-2 und für den Aktivierungsmarker CD25 bzw. für CD45RO, um Memory T-Zellen zu identifizieren [Abb.25]. Hieraus ging hervor, dass der Anteil der CD4^{pos}TLR-2^{pos} Population fast mit dem Anteil der CD25^{pos}TLR-2^{pos} T-Zellen übereinstimmte, die ebenso zu 75% CD45RO^{pos} waren und somit dem Memory-Phänotyp angehörten.

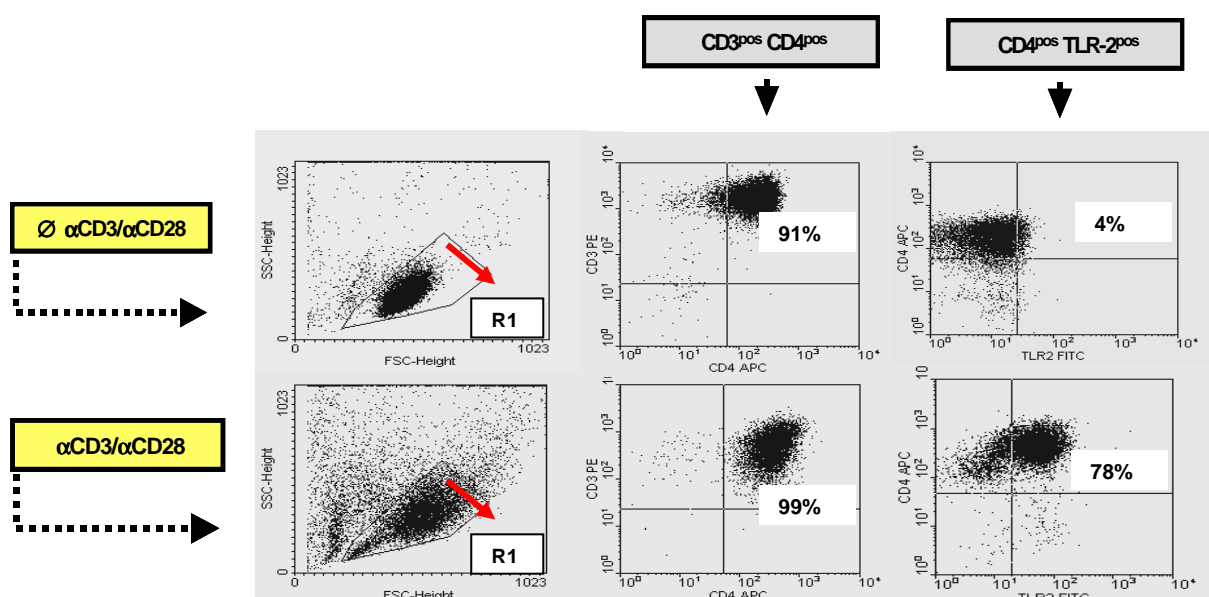


Abb.24: Oberflächenfärbung von TLR-2 auf CD4⁺ T-Zellen direkt nach Aufreinigung sowie nach CD3/CD28 Aktivierung. Jeweils 1×10^5 der direkt aufgereinigten bzw. für 72 Stunden mit α CD3/ α CD28 aktivierten Zellen wurden für die Doppelfärbung mit α CD3 PE und α CD4 APC bzw. mit α CD4 APC und α TLR-2 FITC Antikörpern eingesetzt. Die durchflusszytometrische Analyse, hier exemplarisch von einem nicht-atopischen Spender, bezog sich auf die in der Region R1 befindlichen Population. Die Quadrantenmarker wurden nach den Isotypenkontrollen gesetzt, wodurch das Ausmaß nicht-antigenspezifischer Bindung der Maus-Antikörper erfasst wurde.

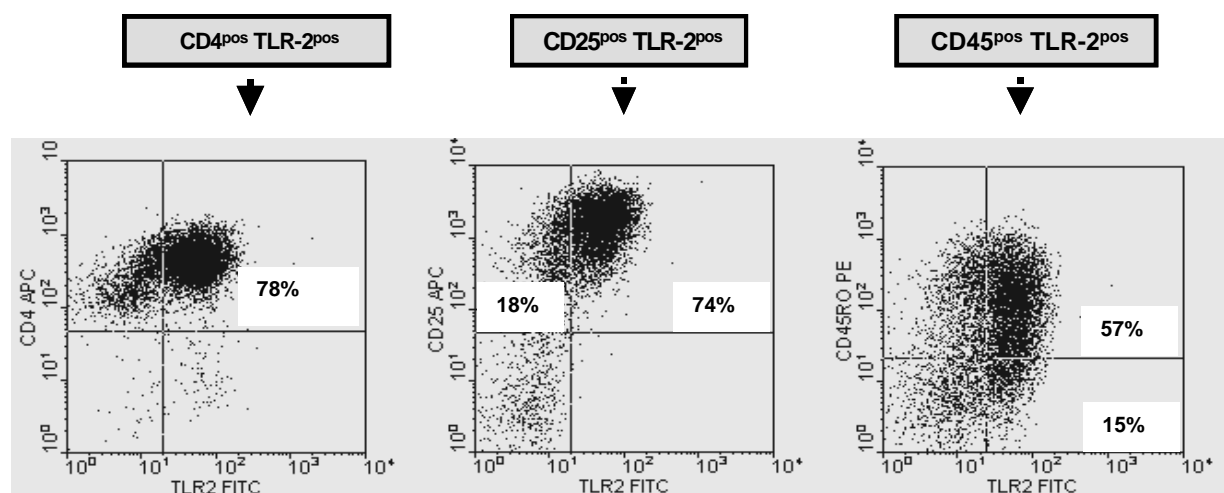


Abb.25: Oberflächenfärbung von TLR-2 auf aktivierten bzw. auf Memory CD4⁺ T-Zellen nach CD3/CD28 Aktivierung. Jeweils 1×10^5 der CD3/CD28 aktivierten Zellen desselben Spenders aus Abbildung 24 wurden zusätzlich mit α CD25 APC und α TLR-2 FITC bzw. mit α CD45RO PE und α TLR-2 FITC Antikörpern gefärbt. Die durchflusszytometrische Analyse bezog sich auf die in der Region R1 befindlichen Population aus Abbildung 24.

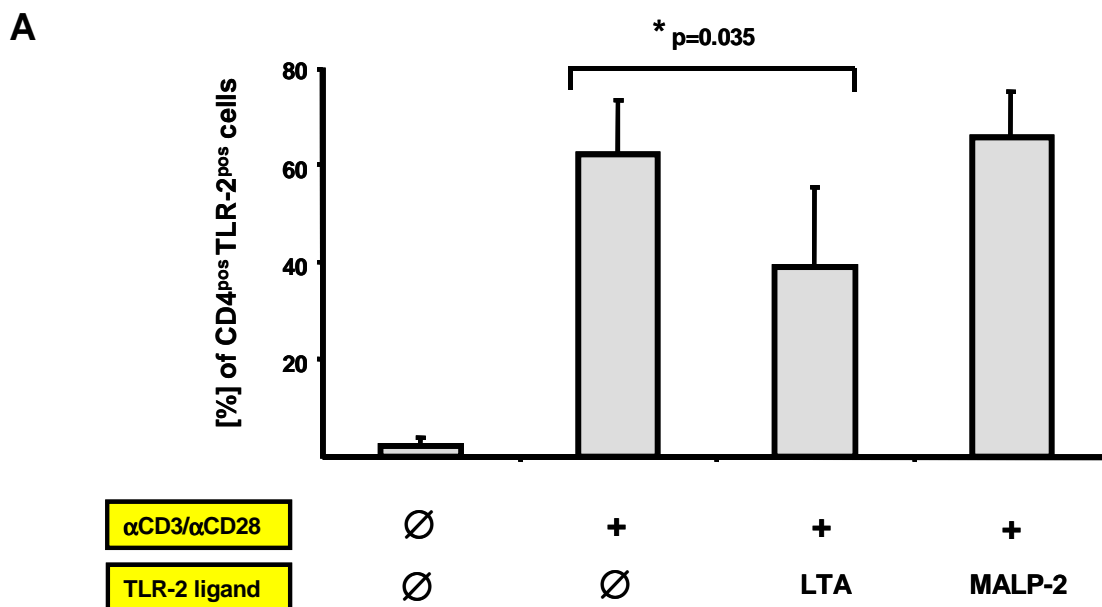
3.4.3. LTA bedingt bei gleichzeitiger T-Zellaktivierung eine verminderte TLR-2 Expression

Um TLR-2 vermittelte Effekte auf T-Zellfunktionen zu analysieren, sollte zumindest geklärt werden, inwiefern die Anwesenheit der entsprechenden Liganden die Expression des Rezeptors selbst beeinflusst. Interessanterweise führte eine weitere 72-stündige Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen mit LTA zu einer fast 25%-igen Reduktion des TLR-2 auf CD4⁺ T-Zellen innerhalb aller untersuchten nicht-atopischen Spender (CD3/CD28: 62% versus CD3/CD28 + LTA: 39%). Im Gegensatz zum LTA hatte die simultane Stimulation mit MALP-2 keinen Einfluss auf die TLR-2 Expression der T-Zellen. Die prozentuale Verteilung des Rezeptors auf CD4⁺ T-Zellen direkt nach Aufreinigung, nach CD3/CD28 Aktivierung sowie nach simultaner Stimulation der aktivierten Zellen mit LTA bzw. MALP-2 innerhalb der nicht-atopischen Spender (n=5) gibt Abbildung 26 A wieder. Während durch alleinige Stimulation mit α CD3/ α CD28 Antikörpern ein Großteil aller aktivierten (CD25^{pos}) T-Zellen TLR-2 exprimierten [Abb.25], waren nach LTA Stimulation bei gleichbleibender

Anzahl der CD25^{pos} Population nur noch zwei Drittel dieser T-Zellen für TLR-2 positiv [Abb.26B]. Ähnliches traf auch für den CD45RO Marker zu.

3.4.4. Die TLR-2 und TLR-6 Expression in CD4⁺ T-Zellen bleibt auf mRNA Ebene unbeeinflusst

Zur Untersuchung des TLR-2 Expressionsprofil auf mRNA Ebene unter Einfluss der entsprechenden Liganden wurden CD4⁺ T-Zellen nach Aufreinigung sowie nach CD3/CD28 Aktivierung im Beisein bzw. bei Fehlen der Liganden hinsichtlich der TLR-2 Transkripte miteinander verglichen. Ebenso konnte zum ersten Mal die Präsenz von TLR-6 in CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden, für das noch keine geeigneten Antikörper existieren. Damit war die theoretische Voraussetzung für eine Stimulation mit MALP-2 gegeben. In Diskrepanz zu den Proteindaten bestand sowohl für TLR-2 als auch für TLR-6 eine gleichbleibende mRNA Expression, d. h., dass selbst direkt nach Aufreinigung die entsprechenden Transkripte detektierbar waren. Umgekehrt jedoch führte die LTA Stimultion nicht zu einer drastisch sichtbar reduzierten TLR-2 Expression im Vergleich zu den rein mit α CD3/ α CD28 Antikörpern aktivierten T-Zellen [Abb.27]. Demnach schien die Rezeptorexpression auf Translationsebene reguliert zu sein.



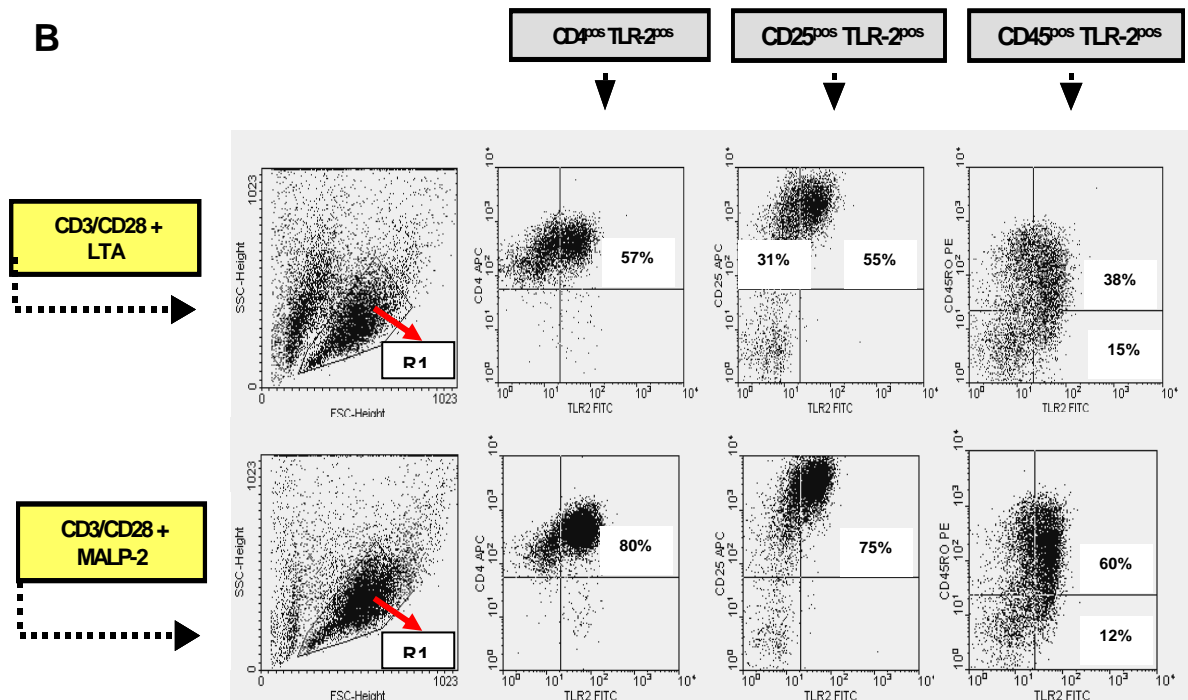


Abb.26: Präsenz von TLR-2 auf CD4⁺ T-Zellen nach CD3/CD28 Aktivierung im Beisein von TLR-2 Liganden. Die prozentualen Durchschnittswerte der durchflusszytometrisch ermittelten CD4^{pos}TLR-2^{pos} T-Zellen aus nicht-atopischen Spendern (n=5) direkt nach Aufreinigung sowie nach CD3/CD28 Aktivierung in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von LTA [30 µg/ml] bzw. MALP-2 [0.3 µg/ml] ergaben nach dem zweiseitigen t-Test für ungepaarte Stichproben eine signifikant reduzierte TLR-2 Expression nach LTA Stimulation im Vergleich zu den aktivierten T-Zellen (A). Jeweils 1 x 10⁵ der CD3/CD28 aktivierten Zellen desselben Spenders aus Abbildung 24 wurden für weitere 72 Stunden mit LTA [30 µg/ml] bzw. MALP-2 [0.3 µg/ml] stimuliert und anschließend mit αCD4 APC und αTLR-2 FITC, mit αCD25 APC und αTLR-2 FITC bzw. mit αCD45RO PE und αTLR-2 FITC Antikörpern gefärbt. Die durchflusszytometrische Analyse bezog sich auf die in der Region R1 befindlichen Population (B).



Abb.27: Qualitativer Nachweis der TLR-2 und TLR-6 Transkripte in CD4⁺ T-Zellen nach Aufreinigung und nach CD3/CD28 Aktivierung im Beisein bzw. bei Fehlen der TLR-2 Liganden mittels PCR. Jeweils 1.5×10^6 CD4⁺ T-Zellen nach Aufreinigung (Bande Nr.1) sowie nach CD3/CD28 Aktivierung in Abwesenheit (Bande Nr.2) bzw. Anwesenheit von LTA [30 µg/ml] (Bande Nr.3); LTA [3 µg/ml] (Bande Nr.4) bzw. MALP-2 [0.3 µg/ml] (Bande Nr.5) und MALP-2 [30 ng/ml] (Bande Nr.6) wurden für die RNA Isolierung mit anschließender reverser Transkription eingesetzt. Der selektive Nachweis der TLR-2 und TLR-6 Transkripte erfolgte durch HotStarTaq PCR mit den in Tabelle 13 aufgeführten Primern (s. Abschnitt 2.4.4. in Material & Methoden). Eine Negativkontrolle mit H₂O anstelle des Templates wurde ebenso einbezogen (Bande Nr.7). Die PCR Produkte wurden auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen und für 1 ½ Stunden bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt.

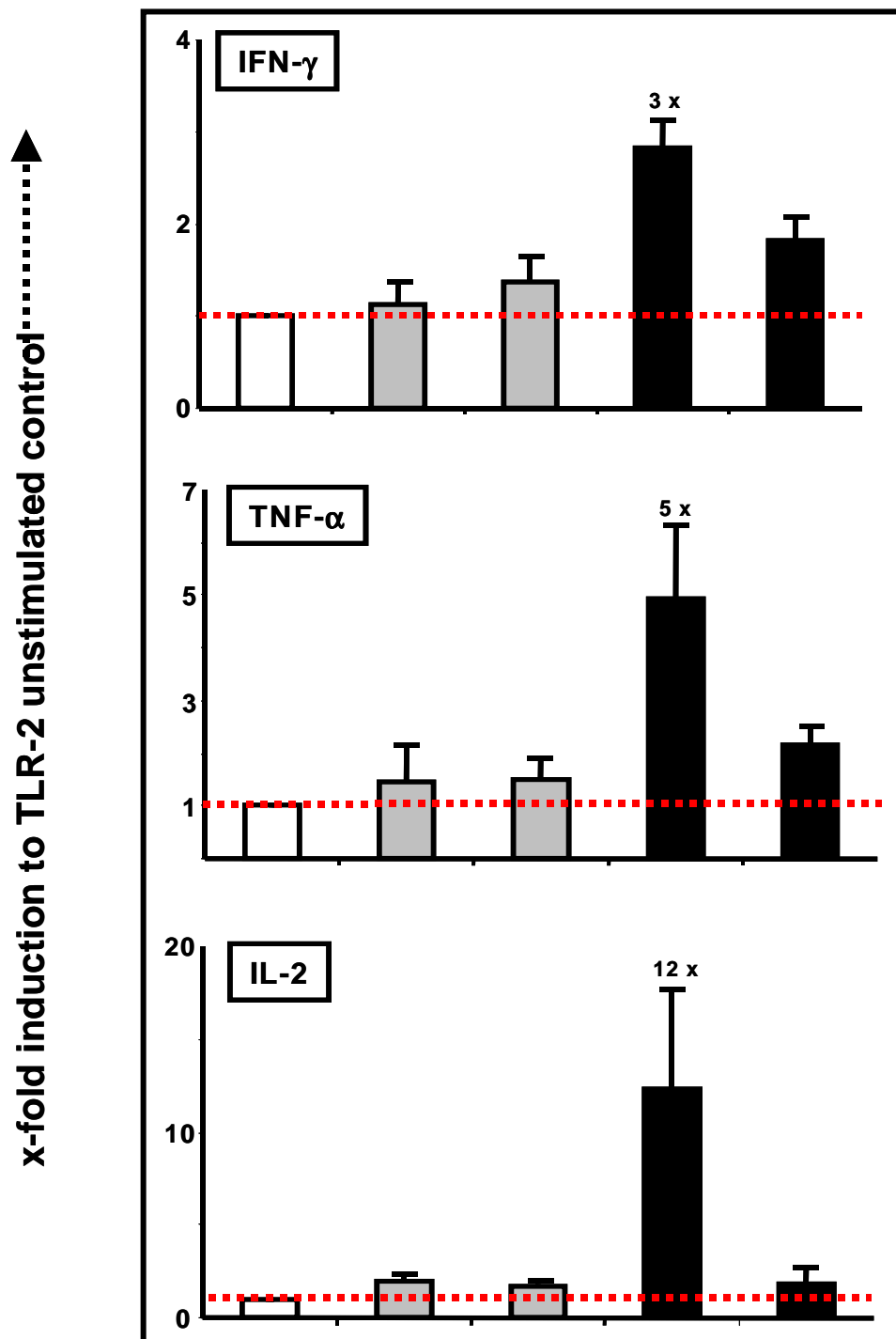
3.4.5. MALP-2 induziert dosisabhängig die Sekretion von T_H1-Zytokinen in aktivierten CD4⁺ T-Zellen und wirkt somit proinflammatorisch

Die Stimulation von aktivierten CD4⁺ T-Zellen mit TLR-2 Liganden führte zu einer differentiellen Freisetzung von Zytokinen. Während die durch LTA bedingte Zytokinexpression mit der von den rein CD3/CD28 aktivierten T-Zellen übereinstimmte, hatte MALP-2 in der höchsten Konzentration und im Vergleich zu den nicht TLR-2 stimulierten Ansätzen eine zusätzliche und selektive Steigerung der T_H1-Zytokinsynthese zur Folge, die durch 3-fach erhöhtes IFN-γ, 5-fach erhöhtes TNF-α, sowie durch 12-fach erhöhtes IL-2 zum Ausdruck kam. Für diese Effekte konnte zudem eine Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden [Abb.28].

3.4.6. Auf mRNA Ebene ist MALP-2 partiell mit einem T_H1 Phänotyp assoziiert

Um festzustellen, inwiefern sich das T_H1/T_H2 Zytokinprofil auf mRNA Ebene äußerte, wurden die stimulierten Zellen aus dem vorigen Abschnitt der RNA Isolierung mit anschließender cDNA-Synthese unterzogen. Die Quantifizierung des T_H1-dirigierenden Transkriptionsfaktors t-bet mittels LightCycler ergab dabei keinen signifikanten Anstieg nach MALP-2 Stimulation. Auch die LTA stimulierten Ansätze zeigten die gleiche Zahl an t-bet Transkripten wie der TLR-2 unstimulierte Ansatz. Allerdings bewirkte die höchste MALP-2 Konzentration eine deutliche Reduktion der GATA-3 Transkription; für diesen Effekt wurde eine inverse Dosisabhängigkeit aufgezeigt [Abb.29]. Bezüglich der T_H1/T_H2 Zytokine induzierte die höchste MALP-2 Konzentration eine doppelt hohe Expression des T_H1-Zytokins IL-2 im Vergleich zum TLR-2 unstimulierten Ansatz. Dahingegen variierte stark die Expression des T_H2-Zytokins IL-13 nach MALP-2 Stimulation. Bei einigen Spendern kam es zu einer deutlichen Expressionssteigerung, bei anderen wiederum

hatte MALP-2 keinen Effekt. Dies spiegelte sich auch in der hohen Standardabweichung dieser Daten wider [Abb.30].



α CD3/ α CD28

+

+

+

+

+

TLR-2 ligand

\emptyset

LTA a)

LTA b)

MALP-2 a)

MALP-2 b)

Abb.28: Quantitativer Nachweis von T_H1 Zytokinen in den Kulturüberständen von aktivierten CD4⁺ T-Zellen nach TLR-2 Stimulation mittels CBA. Jeweils 3×10^6 /ml der CD3/CD28 aktivierten CD4⁺ T-Zellen von nicht-atopischen Spendern (n=5) wurden für weitere 72 Stunden mit LTA [30 µg/ml] (a), LTA [3 µg/ml] (b) bzw. mit MALP-2 [0.3 µg/ml] (a) und MALP-2 [30 ng/ml] (b) stimuliert. Jeder Balken entspricht den Mittelwerten der einzelnen Stimulationsansätze, die in Relation zum TLR-2 unstimulierten Ansatz (dargestellt durch punktierte Linie) stehen.

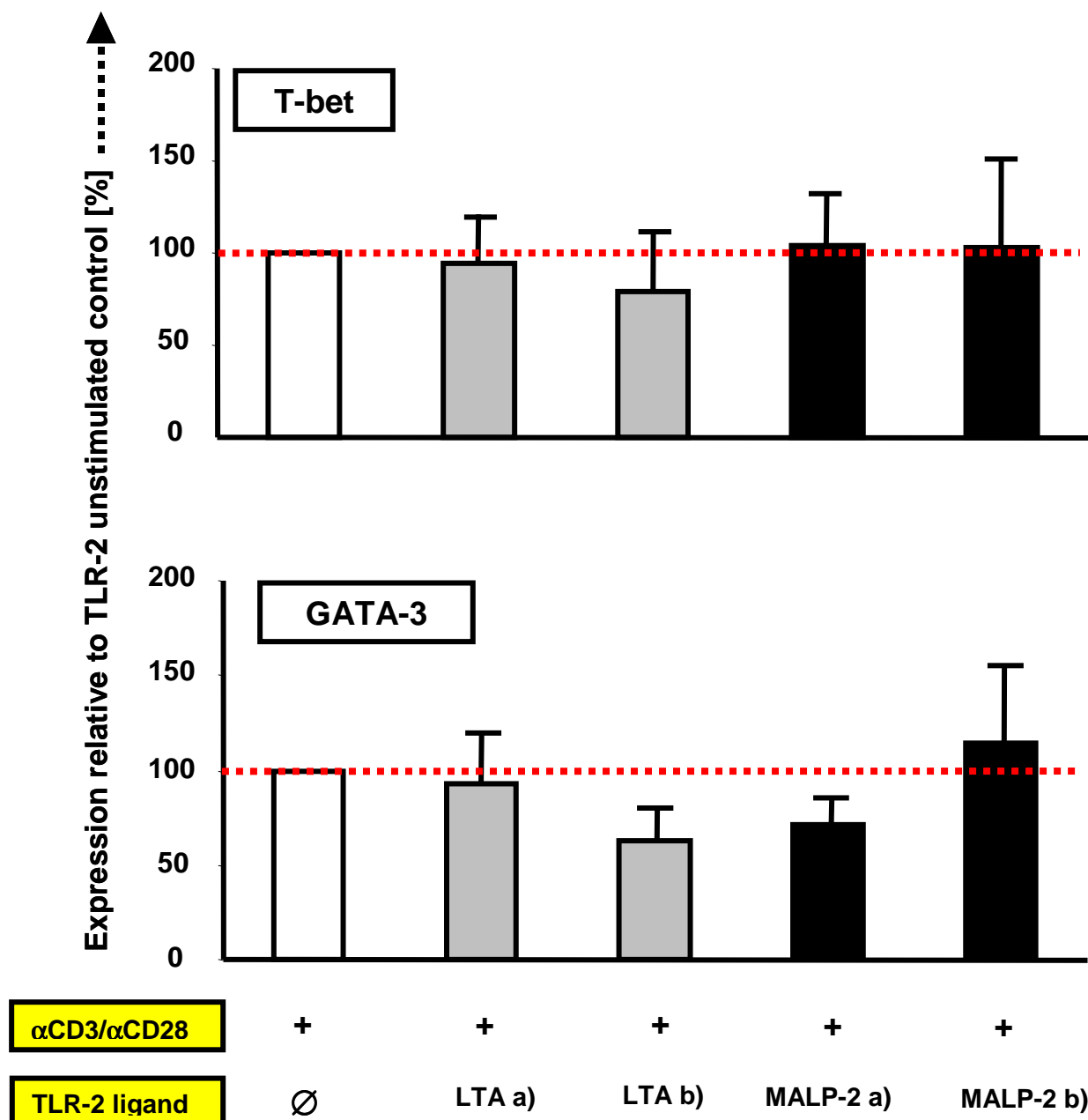


Abb.29: Quantitativer Nachweis der T_H1/T_H2 prägenden Transkriptionsfaktoren t-bet und GATA-3 in den stimulierten Ansätzen aus Abbildung 28 mittels LightCycler. Die relative Expression des TLR-2 unstimulierten Ansatzes (dargestellt durch punktierte Linie) wurde 100% gesetzt; darauf bezogen wurden die prozentualen Expressionen von t-bet und GATA-3 der TLR-2 stimulierten Ansätze ermittelt. Jeder Balken entspricht den Mittelwerten der einzelnen Stimulationsansätze von den nicht-atopischen Spendern (n=5).

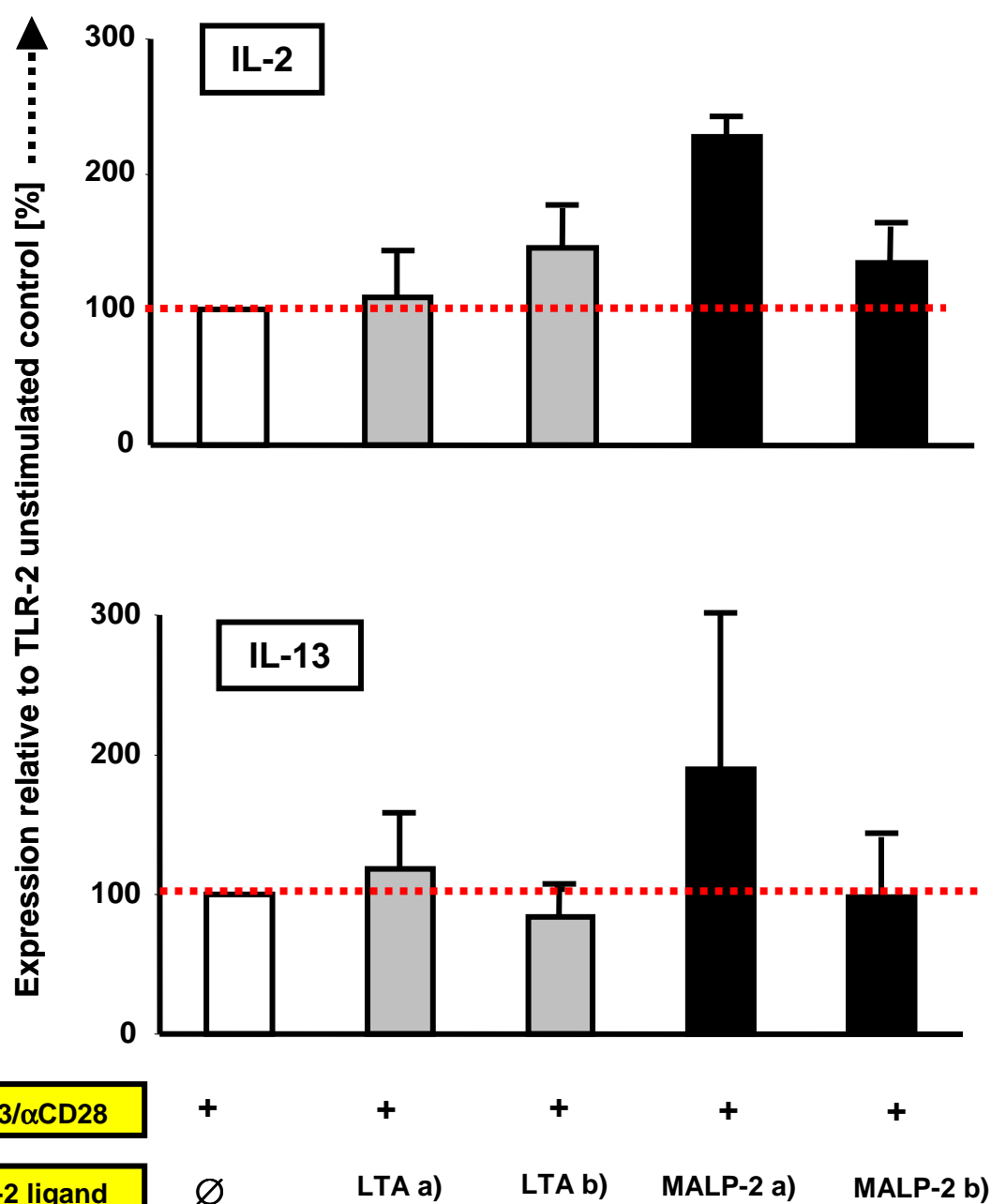


Abb.30: Quantitativer Nachweis der T_H1/T_H2 Zytokine IL-2 und IL-13 in den stimulierten Ansätzen aus Abbildung 28 mittels LightCycler. Die relative Expression des TLR-2 unstimulierten Ansatzes (dargestellt durch punktierte Linie) wurde 100% gesetzt; darauf bezogen wurden die prozentualen Expressionen von IL-2 und IL-13 der TLR-2 stimulierten Ansätze ermittelt. Jeder Balken entspricht den Mittelwerten der einzelnen Stimulationsansätze von den nicht-atopischen Spendern (n=5).

4. DISKUSSION

4.1. Die adaptive Immunantwort trägt zur Pathogenese der atopischen Dermatitis bei

Der andauernde Juckreiz und das dadurch induzierte permanente Kratzen als Folgeerscheinungen der T_H2 -abhängigen Entzündungsmechanismen begünstigt nicht nur die primäre Manifestation des Ekzems, sondern auch neben der gestörten Hautbarrierefunktion die Adhäsion von *S. aureus* durch Freilegung der entsprechenden und durch das T_H2 Zytokinmilieu selbst induzierten epidermalen und dermalen Proteine Fibronectin und Laminin.⁽⁶⁶⁾ Das Fehlen von β Defensin-3⁽⁵¹⁾, einem für die Eradikation von *S. aureus* verantwortlichen antimikrobiellen Peptid, sichert zudem dessen langfristige Besiedlung, die zweifellos eine der bedeutendsten Pathogenitätsfaktoren in der atopischen Dermatitis darstellt. Somit waren 60% der in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit *S. aureus* besiedelt, während bei keinem einzigen hautgesunden Probanden Staphylokokken nachgewiesen werden konnte [Abb.6]. Hierdurch wurde erneut die kutane *S. aureus* Besiedlung als typisches Merkmal der AD hervorgehoben. Ebenso bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein dieses Keims und dem Schweregrad der Erkrankung [Abb.7]. So zeigten Patienten mit *S. aureus* Besiedlung ein schweres Ekzem (Median SCORAD von 54 Punkten), das bei den nicht besiedelten Patienten mit einem Median SCORAD von 40 Punkten deutlich moderater ausfiel. Ein möglicher Defekt der adaptiven Immunantwort, der somit eine beeinträchtigte bakterielle Abwehr zur Folge hätte, wurde jedoch hinsichtlich der atopischen Dermatitis bis heute kaum untersucht. Zu den wenigen Beispielen zählt die in 1985 von Gabrielsen und Brandtzaeg durchgeführte Studie, die eine erhöhte *S. aureus* spezifische IgG-Synthese im Vergleich zum Kontrollkollektiv nachweisen konnte, allerdings den Beitrag dieser Antikörper eher im Zusammenhang einer allergischen Immunreaktion vom Typ II bzw. Typ III diskutierte.⁽¹⁰⁸⁾ Da bakterielle Infektionen häufig auch mit einer IgG-Subklassendefizienz einhergehen⁽¹⁰⁹⁾, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern das Fehlen oder die eingeschränkte Produktion bestimmter IgG-Subklassen für die *S. aureus* Besiedlung verantwortlich sein könnten. Dabei zeigten sich anstelle einer Defizienz allerdings sogar erhöhte IgG1 und IgG4 Titer im Serum der mit *S. aureus* besiedelten Patienten [Abb.9A+D]. Antikörper vom IgG1 Isotyp werden früh nach Kontakt mit einem Proteinantigen gebildet und dominieren hauptsächlich bei bakteriell und viral

bedingten Erkrankungen.⁽¹¹⁰⁾ In Anlehnung zu der Studie von Gabrielsen und Brandtzaeg könnte statt einer protektiven Eigenschaft der IgG1 Antikörper ebenso eine proinflammatorische Wirkung postuliert werden, da diese nach Pathogenerkennung nicht nur das Komplementsystem auf dem klassischen Weg (C1-Weg) aktivieren, sondern auch durch Bindung an entsprechende Rezeptoren auf Monozyten (FcγRI/ FcγRII) mit der daran anschließenden Phagozytose sowie verstärkten Aktivierung dieser Zellen maßgeblich an der Entzündung beteiligt sind. Auch IgG4 Antikörper, die eigentlich den geringsten Anteil innerhalb der IgG-Subklassen ausmachen, binden an FcγRI der Monozyten. Nach chronischer Exposition bestimmter Proteinantigene wird dieser Isotyp vermehrt gebildet⁽¹¹¹⁾ und könnte unter diesen Umständen ebenfalls proinflammatorisch wirken. Die erhöhten IgG1 und IgG4 Titer bei den mit *S. aureus* besiedelten AD Patienten machen deutlich, dass die Suszeptibilität zu diesem Keim nicht auf einer IgG-Subklassendefizienz beruht. Vielmehr hat die ständige Konfrontation mit *S. aureus* eine gesteigerte Immunantwort zur Folge, die sich auf die Pathogenese eher nachteilig auswirken könnte, wofür auch die hohen SCORAD Werte der mit *S. aureus* besiedelten Patienten sprechen würden.

Des weiteren widmete sich diese Arbeit dem Aspekt einer gestörten humoralen Immunität gegenüber staphylogenen Superantigenen in der atopischen Dermatitis, da toxigene *S. aureus* Stämme das Ekzem in besonderem Maße verschlechtern.⁽⁶⁴⁾ Superantigene bewirken aufgrund einer gesteigerten Expression des CLA-Antigens auf T-Zellen⁽¹¹²⁾ nicht nur die Infiltration dieser Zellen in die Haut, sondern verstärken zudem die kutane Entzündung durch Aktivierung von bis zu 20% aller peripheren T-Zellen.⁽⁷⁰⁾ Das in der Arbeit untersuchte Patientenkollektiv war zu 28% mit Superantigen-produzierenden *S. aureus* Stämmen besiedelt, wobei eine hohe Prävalenz zur SEC1 Sekretion bestand [Abb.6]. Der Nachweis von Superantigen-spezifischem IgE in 72% der AD Patienten machte die frühere Exposition, gleichzeitig aber auch die Bedeutung der Toxine hinsichtlich der Erkrankung deutlich. Letzteres spiegelte sich vor allem in der Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Superantigen-spezifischem IgE, dem Schweregrad des Ekzems und der Konzentration an Gesamt-IgE wider [Abb.8A,B], die um fast das 17-fache erhöht war und auf die mögliche Bedeutung des IgE-vermittelten Antigenpräsentationsweges sowie die dadurch verstärkte T-Zellaktivierung hinweist.⁽⁴²⁾ Hier stellt sich die Frage, weshalb die Präsenz von Superantigenen bis zu einer IgE-Sensibilisierung und den damit verbundenen Effekten in der atopischen Dermatitis fortschreitet?

Studien für das Toxische-Schock-Syndrom konnten belegen, dass eine natürlicherweise induzierte Immunität vor der Erkrankung schützt, da nämlich die betroffenen Individuen anders als die Kontrollpersonen niedrigere anti-TSST-1 Antikörpertiter besaßen.⁽¹¹³⁾ Im Zusammenhang der unzureichenden Protektion gegenüber Superantigenen in der atopischen Dermatitis haben demnach Campbell und Kemp eine verminderte spezifische Antikörpersynthese als mögliche Ursache der Superantigen-vermittelten Erkrankung postuliert. Stattdessen stellten sie erhöhte SEB spezifische IgG-Titer bei Kindern mit atopischer Dermatitis fest, die sie als Folgeerscheinung der SEB-Exposition deuteten.⁽¹¹⁴⁾ Jedoch ließ diese Arbeit keine Rückschlüsse über quantitative Unterschiede der IgG-Subklassen zu, woraus eine mangelnde Protektion gegenüber den Toxinen ebenso resultieren könnte.

Bei der Erkennung von Polysaccharidantigenen, die vorzugsweise bei bekapselten Bakterien, darunter auch *S. aureus*, zu finden sind, spielen IgG2 Antikörper eine besonders wichtige Rolle⁽¹¹⁵⁾. Nach Antigenerkennung binden diese an Fcγ1 Rezeptoren von neutrophilen Granulozyten und unterstützen so Phagozytose und Eliminierung der entsprechenden Pathogene.⁽¹¹⁶⁾ Da rezidivierende Infektionen der Atemwege u. a. als Folge einer selektiven IgG2 Defizienz bei sonst normaler IgG2 Synthese berichtet wurden⁽¹¹⁷⁾, könnte eine ähnliche Situation auch im Hinblick auf Superantigen-spezifische IgG2 Antikörper zutreffen. Als für AD Patienten hier relevant erscheinende Superantigene zählten SEB und SEC1. Tatsächlich konnte eine SEC1 spezifische IgG2 Defizienz in fast 40% der AD Patienten jedoch kaum bei Kontrollen festgestellt werden. Allerdings bestand keine direkte Korrelation zwischen den α-SEC1 IgG2 defizienten Patienten und dem aktuellen *S. aureus* Besiedlungsstatus, wodurch die Fluktuation in der kutanen Besiedlung zur Geltung kam [Abb.10A]. Eine beeinträchtigte Kapazität bezüglich der Synthese weiterer SEC1 spezifischer IgG-Subklassen lag ebenfalls nicht vor. Im Gegenteil dazu zeigten die betroffenen Patienten erhöhte SEC1 spezifische IgG1 und IgG4 Titer im Vergleich zu den Kontrollen sowie zu den Patienten mit vorhandenen α-SEC1 IgG2 Antikörpern [Abb.11A,B]. Ein kompensatorischer Effekt dieser IgG-Subklassen ist aufgrund der niedrigeren Affinität zum Antigen und damit der beeinträchtigten Funktion auszuschließen.⁽¹¹⁸⁾ Stattdessen könnten diese Isotypen, wie bereits erwähnt, eher proinflammatorische Eigenschaften besitzen. Die normale IgG2 Synthese gegen SEB [Abb.10B] sowie gegen PCP [Abb.12], einem klassischen IgG2 Antigen, aber auch die normale IgG2 Synthese im allgemeinen [Abb.13B] verdeutlichen den Aspekt, dass die selektive IgG2 Defizienz tatsächlich auf das Superantigen SEC1 beschränkt ist.

Verschiedene Erklärungsansätze könnten für die Selektivität der IgG2 Defizienz in Frage kommen. Neun Gene kodieren für die schwere Kette der konstanten Region humaner Immunglobuline (μ - δ - γ 3- γ 1- ψ ϵ - α 1- ψ γ - γ 2- γ 4- ϵ - α 2), die in zwei γ - γ - ϵ - α Blöcke aufgeteilt sind.⁽¹¹⁹⁾ Die für IgG2 und IgG4 kodierenden Gene sind gemeinsam auf einem Block lokalisiert, so dass ein genereller Defekt im „Switching“ ausgeschlossen werden kann, da sonst parallel zur α -SEC1 IgG2 Defizienz auch die entsprechenden IgG4 Antikörper fehlen müssten. Des weiteren ist bekannt, dass bestimmte Zytokine am Prozess des Isotypen-Klassenwechsels beteiligt sind, indem sie die Rekombinase für die vorgesehene Stelle zugänglich machen. So gilt IFN- γ zusammen mit IL-6 als ein bedeutender „Switch“ Faktor, um die IgG2 Synthese in humanen B-Zellen zu induzieren.⁽¹²⁰⁾ Es erscheint paradox, dass ein T_H2-dominiertes Zytokinmilieu die IgG2 Synthese gegen ein einzelnes spezifisches Antigen inhibiert. Jedoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nur PBMCs der α -SEC1 IgG2 defizienten Patienten IL-4 und IL-5 nach SEC1-Restimulation sezernierten, während diese Zytokine von PBMCs der Patienten mit bzw. ohne SEC1 spezifische IgG2 Antikörper nach SEB-Restimulation gleichermaßen sezerniert wurden [Abb.14]. Eine solche Beobachtung läßt die Präsenz von ausschließlich SEC1 spezifischen T_H2-Zellen innerhalb der defizienten Patientengruppe spekulieren. Neben dem auffallenden SEC1-Toxinprofil der Hautabstriche decken sich interessanterweise auch die in-vitro Daten mit den Befunden von Yoshioka et al.⁽¹²¹⁾ Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass DS-Nh Mäuse mit einem typischen AD-Phänotyp nicht nur präferentiell mit SEC sezernierenden *S. aureus* Stämmen besiedelt waren, sondern dass auch die aus den Mäusen isolierten Milzzellen nach SEC-Restimulation im Vergleich zur Stimulation mit anderen Superantigenen am stärksten IL-4 produzierten. So deutet einiges daraufhin, dass die selektive IgG2 Defizienz mehr auf die Eigenschaften von SEC1 selbst zurückzuführen ist. Tatsächlich aktiviert dieses Superantigen lediglich T-Zellen, die den T-Zellrezeptor mit BV8S2 Elementen aufweisen.⁽¹²¹⁾ NKT Zellen sind Träger eines solchen Rezeptors und gelten als Hauptproduzenten von IL-4.⁽¹²²⁾ Es wäre also durchaus denkbar, dass SEC1 ein spezielles T_H2-Mikromilieu schafft, wodurch selektiv die Synthese der entsprechenden IgG2 Antikörper unterbunden wird. Dies wiederum setzt die Präsenz des Superantigens voraus. Obwohl nur ein Drittel der mit SEC1-Stämmen besiedelten Patienten in die IgG2 defiziente Gruppe fielen, so entwickelten dennoch fast alle der betroffenen Patienten SEC1 spezifische IgG1 und IgG4 Antikörper; 45% von ihnen waren sogar gegen SEC1 sensibilisiert. Die Anwesenheit dieser Antikörper läßt somit auf eine frühere Exposition mit dem Superantigen schließen. Ein weiteres Argument für die Besonderheit von SEC1 als Ursache der selektiven IgG2 Defizienz könnte die durch Zink vermittelte Dimerisierung

des Toxins seins⁽¹²³⁾, wodurch möglicherweise bestimmte Antigen determinanten vom entsprechenden B-Zellrezeptor nicht mehr erkannt werden, und somit die IgG2 Synthese ausbleibt.

Um auf den Aspekt der mangelnden Protektion gegenüber Superantigenen in der atopischen Dermatitis zurückzukommen, so scheint die SEC1 spezifische IgG2 Defizienz nicht der Grund für eine SEC1-induzierte Antwort zu sein, da selbst Patienten mit SEC1 spezifischen IgG2 Antikörpern vor einer IgE Sensibilisierung gegenüber diesem Toxin nicht geschützt waren. Dennoch bestand ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und dem Fehlen der α -SEC1 IgG2 Subklasse, da mehr als zwei Drittel der α -SEC1 IgG2 defizienten Patienten einen SCORAD von mehr als 40 Punkten besaßen, während fast zwei Drittel der Patienten mit SEC1 spezifischen IgG2 Antikörpern einen SCORAD von weniger als 40 Punkten aufwiesen [Tab.16]. Obwohl die funktionelle Bedeutung dieser Antikörper nicht untersucht wurde, so könnte dennoch das mit den defizienten Patienten assoziierte T_H2 -Profil für den schweren Verlauf der Erkrankung verantwortlich sein. Trotzdem war die mangelnde Protektion gegenüber den Toxinen nicht in quantitative Unterschiede des Superantigen-spezifischen IgG-Profiles zu sehen. Um jedoch festzustellen, ob dies mit einer eingeschränkten funktionellen Kapazität der entsprechenden Antikörper zusammenhängen könnte, wurden Gesamt-IgG Fraktionen aus Patientenseren gewonnen, die Anzeichen einer unzureichenden Protektion gegenüber SEB bzw. SEC1 zeigten (definiert am Grad der IgE-Sensibilisierung). Tatsächlich stellte sich heraus, dass zum Erreichen einer 50%-igen Inhibition der SEC1-induzierten T-Zellantwort fast die doppelte Menge der aus den Patienten gewonnenen IgG-Antikörper notwendig war im Vergleich zu den aus Kontrollen isolierten Antikörpern [Abb.15A]. Dies deutete darauf hin, dass die in den Patientenseren enthaltenen SEC1 spezifischen IgG-Antikörper das entsprechende Toxin möglicherweise weniger effizient neutralisierten. Somit könnte auf Ebene der Funktionalität der IgG-Antikörper ein möglicher Grund für die unzureichende Protektion gegenüber den Superantigenen identifiziert worden sein, wobei analog zu den quantitativen Untersuchungen erneut die besondere Rolle von SEC1 in der Pathogenese der atopischen Dermatitis hervorgeht.

4.2. Die heterozygote TLR-2 R753Q Mutation gilt als weiteres Merkmal der atopischen Dermatitis & ist mit einer schweren Verlaufsform der Erkrankung assoziiert

Wie im letzten Abschnitt ausführlich diskutiert, konnte auf Seiten der adaptiven Immunantwort kein direkter Zusammenhang zur erhöhten *S. aureus* Besiedlung festgestellt werden. Allerdings sind an der Erkennung und Eliminierung von Pathogenen auch angeborene Abwehrmechanismen beteiligt, wobei Toll-like Rezeptoren eine besondere Schlüsselfunktion einnehmen. Nach Aktivierung induzieren sie die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine und leiten so die Entzündungsantwort gegenüber eindringenden Pathogenen ein. TLR-2 ist wesentlich an der Abwehr von *S. aureus* beteiligt, da eine subkutane Injektion dieses Keims in TLR-2 defizienten Mäusen, nicht aber in Wildtyp-Tieren, eine intradermale *S. aureus* Besiedlung zur Folge hat.⁽⁹⁴⁾ Theoretisch könnten Mutationen im Gen des Rezeptors mit einem Funktionsverlust einhergehen und beim Menschen das Risiko zur Staphylokokken-Infektion erhöhen. Eine derartige Mutation konnte in der TIR-Domäne des TLR-2 Gens tatsächlich identifiziert werden, die einen Aminosäureaustausch des hoch konservierten Arginins in der Position 753 durch Glutamin bedingt. Diese R753Q Mutation tritt zu 3% in der Bevölkerung auf und wurde mit einer erhöhten Suszeptibilität zu *S. aureus* assoziiert.⁽⁹⁵⁾ Erst kürzlich konnte in einer anderen Studie mit 151 Tuberkulose Patienten gezeigt werden, dass 18% der betroffenen Individuen Träger der TLR-2 R753Q Mutation waren, und somit die Erkrankung vielleicht aus einer beeinträchtigten Abwehr von *Mycobacterium tuberculosis* resultierte.⁽¹²⁴⁾ Dass eine TLR-2 Aktivierung zu einer direkten Abtötung dieser Erreger durch Alveolar-Makrophagen führt, ist bereits beschrieben. Auch die TLR-2 R677W Mutation, die einen Aminosäureaustausch des Arginins zum Tryptophan in der Position 677 der TIR-Domäne zur Folge hat, scheint in Verbindung zu einer bakteriell bedingten Erkrankung zu stehen. So trat in einem koreanischen Kollektiv diese Mutation bei 22% der an Lepra erkrankten Personen auf, woraus eine verminderte Antwort auf *Mycobacterium leprae* geschlossen werden konnte.⁽¹²⁵⁾ Insgesamt verdeutlichen diese Daten die Bedeutung eines intakten TLR-2 für die Abwehr von gram-positiven sowie von mykobakteriellen Pathogenen.

Inwiefern jedoch die genannten TLR-2 Mutationen vermehrt in der atopischen Dermatitis auftreten und somit einen möglichen Erklärungsansatz für die erhöhte Suszeptibilität zu

S. aureus darstellen, wurde bislang nicht untersucht. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass 11.5% (9 von 78) der AD Patienten heterozygot für die TLR-2 R753Q Mutation waren; im Vergleich dazu lag die Prävalenz im Kontrollkollektiv bei 2.5% (1 von 39) [Abb.16]. Dahingegen konnte die TLR-2 R677W Mutation weder bei den Patienten noch bei den Kontrollen identifiziert werden, ein Ergebnis, welches mit den Befunden in der Arbeit von Schröder et al. übereinstimmt.⁽¹²⁶⁾ Diese Beobachtung lässt annehmen, dass die TLR-2 R677W Mutation präferentiell im asiatischen Raum vorkommt. Neben den TLR-2 Mutationen wurden auch die cosegregierenden D299G/T399I Mutationen in der extrazellulären Domäne des TLR-4 Gens im Patientenkollektiv bestimmt, die zum Austausch von Alanin durch Glycin in der Position 299 sowie zum Austausch von Threonin durch Isoleucin in der Position 399 führen.⁽¹⁰⁶⁾ Interessanterweise waren 12% (9 von 76) der AD Patienten gegenüber 2.5% (1 von 39) der Kontrollen heterozygote Träger dieser Mutationen [Abb.16]. Da diesen eigentlich eine Bedeutung bei Infektionen mit gram-negativen Bakterien zugeschrieben wird, erschien ihre Assoziation mit der atopischen Dermatitis überraschend. Allerdings ist bekannt, dass TLR-4 auch Mannanstrukturen von *Candida albicans* erkennt⁽¹²⁷⁾, und die Arbeitsgruppe um Savolainen et al. eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der atopischen Dermatitis und der Höhe von *Candida-albicans* spezifischem IgE bei Patienten mit intestinaler Candidabesiedlung feststellen konnte.⁽¹²⁸⁾ Somit könnten TLR-4 Mutationen die Besiedlung mit einem derartigen Pilz in der atopischen Dermatitis begünstigen. Zumindest in TLR-4 defekten C3H/HeJ Mäusen ist eine deutlich erhöhte *C. albicans* Besiedlung im Vergleich zu den C3H/HeN Kontrollmäusen beobachtet worden.⁽¹²⁹⁾ Bei der Analyse des Patientenkollektivs fiel weiterhin auf, dass die TLR-2 R753Q und TLR-4 D299G/T399I Mutationen nicht simultan bei den Individuen auftraten; fasste man jedoch die TLR-2 bzw. TLR-4 polymorphen Patienten bzw. Kontrollen zusammen, so zeigte sich bei Gegenüberstellung eine signifikante Prävalenz für das Auftreten beider Mutationen in der atopischen Dermatitis [Abb.16], was auf eine Bedeutung hinsichtlich der Pathogenese hinweist.

Nachdem tatsächlich eine Gruppe von AD Patienten als Träger der TLR-2 R753Q Mutation identifiziert wurde, stellte sich die Frage, ob zumindest bei diesen Individuen ein direkter Bezug zur *S. aureus* Besiedlung bestand. Die Korrelation zum bakteriellen Besiedlungsstatus ergab, dass TLR-2 polymorphe Patienten ein 55%-iges Risiko zur kutanen Besiedlung mit diesem Keim besaßen [Abb.17]. Zudem zeichneten sich Patienten mit der TLR-2 R753Q Mutation durch einen besonderen Phänotyp aus. So

zeigten sie mit einem Median SCORAD von 56 Punkten eine schwere Verlaufsform der AD, die sich bei den nicht-polymorphen Patienten und den Patienten mit TLR-4 Mutationen mit einem Median SCORAD von 45 bzw. 40 Punkten dagegen eher moderat äußerte. Neben der klassischen Funktion bei der Pathogenabwehr sind Toll-like Rezeptoren außerdem an der Prägung der T_H1/T_H2 Antwort und nachgeschalteter Mechanismen beteiligt, was sich u. a. auch in den IgE-Daten der Patienten deutlich widerspiegelte. So waren die höchsten Gesamt-IgE und allergenspezifischen IgE-Titer bei den TLR-2 polymorphen Patienten zu verzeichnen, während Patienten mit TLR-4 Mutationen die niedrigsten Gesamt-IgE und allergenspezifischen IgE-Titer zeigten [Abb.18]. Demzufolge scheinen die TLR-2 R753Q und TLR-4 D299G/T399I Mutationen differentielle Auswirkungen auf das T_H1/T_H2 Profil zu haben. Während die TLR-2 Mutation offensichtlich zu einer verstärkten T_H2 -Antwort beiträgt, woraus die im Vergleich zu den nicht-polymorphen Patienten erhöhten IgE-Titer resultieren würden, macht es den Anschein, dass die TLR-4 Mutationen die T_H2 -Antwort eher inhibierten. Tatsächlich konnte erst kürzlich ein erhöhtes Atopierisiko bei Menschen mit Mutationen in der Promotorregion des TLR-2 Gens gezeigt werden⁽¹³⁰⁾, eine zu unseren Daten analoge Beobachtung. Im Gegensatz dazu berichtete die Arbeitsgruppe um Dabbagh et al. einen stark reduzierten allergischen Phänotyp, u. a. begleitet von niedrigen allergenspezifischen IgE-Titern bei TLR-4 defizienten Mäusen, woraus auf die Notwendigkeit eines funktionell aktiven TLR-4 für die Ausbildung einer optimalen T_H2 -Antwort geschlossen wurde.⁽¹³¹⁾ Im Hinblick auf die Pathogenese der atopischen Dermatitis haben somit TLR-2 bzw. TLR-4 Mutationen unterschiedliche Effekte. So könnte die TLR-2 R753Q Mutation aufgrund einer verstärkten T_H2 -Immunantwort die IgE-Synthese potenzieren und damit den Verlauf der Erkrankung erschweren, da die Höhe des Serum-IgE mit der Intensität der Erkrankung korreliert.⁽⁴³⁾ Umgekehrt würde das für die TLR-4 polymorphen Patienten bedeuten, dass ihr Ekzem aufgrund niedriger IgE-Titer milder verläuft, wofür auch ihre im Vergleich zu den TLR-2 polymorphen Patienten niedrigen SCORAD Werte sprechen würden.

Da sich die TLR-2 R753Q Mutation als möglicher neuer Pathogenitätsfaktor in der atopischen Dermatitis herausstellte, wurde die Punktmutation in die in einem Expressionsplasmid klonierte humane TLR-2 cDNA inseriert. Parallel erfolgte eine Mutagenese zur Generierung des TLR-2 P681H Kontrollkonstrukts, welches in Mäusen als dominant-negativ beschrieben wurde und in RAW Zellen die TNF- α Produktion nach Aktivierung mit *M. tuberculosis* inhibierte.⁽¹²⁵⁾ Bisher beschränkten sich in-vitro Untersuchungen mit der R753Q Mutante lediglich auf Transfektionen mit dem alleinigen

Konstrukt, wodurch allerdings nur die homozygote Situation simuliert wurde. Um jedoch die funktionelle Relevanz der in den Patienten vorkommenden heterozygoten Situation zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit durch das Beisein des Wildtyp TLR-2 Konstrukts die heterozygote Mutation in-vitro simuliert. Die Überlegung, die heterozygote Mutation durch ein 50:50 Gemisch aus mutiertem und Wildtyp TLR-2 Konstrukt zu simulieren, setzte zunächst eine dosisabhängige TLR-2 vermittelte Antwort nach Stimulation voraus. Tatsächlich konnte nach Transfektion unterschiedlicher TLR-2 Konstrukt Mengen in HEK293 Zellen bei einheitlicher LTA-Stimulation ein linearer Anstieg von aktiviertem NFκB mit zunehmender Expression des Rezeptors erzielt werden [Abb.19]. Damit wurde erstmalig der Einfluss des Grads der Rezeptorexpression und der Effizienz der Antwort gezeigt. Darüberhinaus war zu beobachten, dass die R753Q Mutante selbst noch über eine 50%-ige Residualaktivität verfügte. Durch Heterodimerisierung des mutierten Konstrukts mit dem endogenen TLR-1 (für die Erkennung von dreifach acetylierten Lipoproteinen wie Pam3Cys erforderlich⁽⁸³⁾) bzw. mit dem kotransfizierten TLR-6 (für die Erkennung von zweifach acetylierten Lipoproteinen wie MALP-2 erforderlich⁽⁸³⁾) konnte nach Pam3Cys-Stimulation eine 60%-ige und nach MALP-2 Stimulation sogar eine 90%-ige NFκB Antwort induziert werden [Abb.20A]. Dies würde bedeuten, dass homozygote TLR-2 R753Q Mutationsträger kaum gegen Infektionen mit Keimen anfällig sind, bei denen zweifach acetylierte Lipoproteine dominieren. Andererseits wurde deutlich, dass die Präsenz von nur 50% Wildtyp-Konstrukt im Beisein von 50% TLR-9 (als Kontrollkonstrukt) nicht für eine 100%-ige Antwort ausreichte, womit erneut der Aspekt der Dosisabhängigkeit der TLR-2 vermittelten Antwort untermauert wurde. In Diskrepanz zu der in der Arbeit von Aulock et al. aufgestellten Behauptung⁽¹³²⁾ konnte bewiesen werden, dass ein funktionelles TLR-2 Gen nicht für eine vollständige Antwort genügte. Gleichzeitig kam zum Ausdruck, dass TLR-9 sowohl durch LTA nicht aktiviert werden konnte, was bereits aus den Titrationsdaten aus Abbildung 19 hervorging, zusätzlich aber auch keine unspezifische, Rezeptor-getriggerte Aktivierung zur Folge hatte. D. h., sollten Effekte bei der Kombination des Wildtyp-Konstrukts mit dem mutierten Konstrukt zu sehen sein, so wären diese spezifisch auf die Mutation, nicht aber auf die Rezeptorinteraktion zurückzuführen.

Betrachtet man schließlich die Daten zu der heterozygoten TLR-2 R753Q Mutation, so wurde ersichtlich, dass aufgrund der Residualaktivität der R753Q Mutante eine 100%-ige NFκB Antwort unabhängig vom TLR-2 Stimulus erfolgte [Abb.20A]. Sowohl die

heterozygote R753Q als auch die P681H Mutation entsprachen der TLR-2 Wildtyp-Situation. In der homozygoten Situation fiel allerdings auf, dass die Kontrollmutante eine deutlich niedrigere Residualaktivität besaß, und die funktionellen Ausfälle selbst durch Heterodimerisierung mit TLR-1 bzw. mit TLR-6 nur marginal behoben werden konnten [Abb.20B]. Um die heterozygote TLR-2 R753Q Mutation auf Effektorebene zu analysieren, wurde IL-8 in den Kulturüberständen derselben Transfektanten bestimmt, die bereits für die zelluläre NFκB Messung eingesetzt wurden. In Diskrepanz zu den NFκB Daten war die IL-8 Sekretion allerdings durch die heterozygote TLR-2 R753Q Mutation bis zu 20% beeinträchtigt, und zwar unabhängig von der Art des TLR-2 Liganden. Homozygote R753Q Transfektanten konnten sogar auf die MALP-2 Stimulation nur noch zu 60% antworten [Abb.21A]. Wurde als weiteres Effektormolekül das Chemokin IP-10 herangezogen, so hatte die heterozygote TLR-2 R753Q Mutation hierauf, analog zu den NFκB Daten, keinen Einfluss [Abb.22A]. Dies implizierte die differentielle Regulation der beiden NFκB-abhängigen Chemokine. Allerdings machte die IP-10 Messung besonders im Fall der MALP-2 Stimulation deutlich, dass die Erkennung von zweifach acetylierten Lipoproteinen weniger auf die Präsenz eines funktionellen TLR-2 angewiesen war. Zu den abschließenden Untersuchungen zählte die Stimulation der homozygoten und heterozygoten R753Q Transfektanten mit hitzeinaktivierten *S. aureus* Keimen, um den tatsächlichen Bezug zwischen dieser Mutation und einer Antwort auf Staphylokokken zu untersuchen. Hierbei zeigte sich für NFκB und IP-10 eine 30% bis 50% reduzierte Antwort im homozygoten und eine normale Antwort im heterozygoten System [Abb.23]. Dahingegen war die IL-8 Sekretion der heterozygoten R753Q Transfektanten zu 40% beeinträchtigt [Abb.23].

Zusammenfassend ging aus allen in-vitro Untersuchungen hervor, dass die IL-8 Synthese durch die heterozygote TLR-2 R753Q Mutation inhibiert wird. Auf die atopische Dermatitis übertragen wäre das folgende Modell denkbar: Keratinozyten, als Epithelzellen den HEK293 Zellen analog, würden im Fall von heterozygoten Mutationsträgern einen mutierten, parentalen TLR-2 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die Konfrontation mit staphylogenen Komponenten hätte dann nur eine eingeschränkte IL-8 Sekretion zur Folge. Unter diesen Umständen könnten weniger neutrophile Granulozyten rekrutiert und somit die Keime schlechter eliminiert werden. Hierdurch wären optimale Bedingungen für eine langfristige *S. aureus* Besiedlung gegeben. Dass 55% der in dieser Arbeit identifizierten Mutationsträger zur Staphylokokken-Besiedlung neigten, könnte auf diesen Pathomechanismus zurückzuführen sein.

4.3. *S. aureus* könnte zur lokalen Entzündung und zur T_H1-vermittelten Chronifizierung des Ekzems beitragen, indem es direkt mit T-Zellen über TLR-2 interagiert

Neben dem Versuch, ein besseres Verständnis zur rezidivierenden *S. aureus* Besiedlung in der atopischen Dermatitis zu erlangen, galt es ferner zu verstehen, weshalb sich das Ekzem auch in Anwesenheit nicht-toxischer *S. aureus* Stämme und bei Fehlen Superantigen-spezifischer IgE Antikörper verschlechterte. Dies implizierte das Vorhandensein weiterer, bisher nur wenig charakterisierter Mechanismen, über die *S. aureus* das Entzündungsgeschehen ebenfalls beeinflussen kann. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass das sezernierte α -Toxin eine starke T_H1-Antwort in CD4⁺ T-Zellen induziert.⁽¹³³⁾ Aufgrund der starken Präsenz von CD4⁺ T-Zellen in der Haut und der Tatsache, dass Peptidoglycan und Lipoteichonsäure über TLR-2 Signale vermittelt en können⁽⁹¹⁾, ließ entgegen dem bisherigen Wissenstand über eine direkte, TLR-2 vermittelte T-Zellaktivierung in Anwesenheit von *S. aureus* bzw. staphylogener Komponenten spekulieren. Die Expression von TLR-2 in humanen CD4⁺ T-Zellen ist bisher nur in der Publikation von Komai-Koma et al. beschrieben⁽¹³⁴⁾, konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Durch Positivselektion von CD4⁺ T-Zellen aus PBMCs nicht-atopischer Spender konnte eine reine, nicht durch die Prozedur selbst voraktivierte T-Zellpopulation isoliert werden. Eine Kontamination mit CD4⁺ Monozyten war aufgrund einer fehlenden CD3-negativen Population auszuschließen [Abb.24]. Dies ermöglichte eine Analyse direkter TLR-2 getriggelter T-Zelleffekte. Im Gegensatz zu den Daten von Komai-Koma et al. ließ sich eine konstitutive TLR-2 Expression auf Memory T-Zellen allerdings nicht nachweisen. So exprimierten CD4⁺ T-Zellen direkt nach Aufreinigung den Rezeptor nur sehr schwach [Abb.24]. Erst nach Stimulation in Anwesenheit von α CD3 und α CD28 Antikörpern wurde ein deutlicher Nachweis von TLR-2 auf der Oberfläche dieser Zellen möglich [Abb.24]. Außerdem konnte im Unterschied zu Komai-Koma et al. die TLR-2 Expression in durchschnittlich 60% aller CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden. Die weitere Charakterisierung der CD4^{pos}TLR-2^{pos} Population ergab ferner, dass TLR-2 erst nach einer T-Zellaktivierung größtenteils auf CD4⁺ T-Zellen vom Memory-Phänotyp lokalisiert war [Abb.25].

Um nun festzustellen, inwiefern staphylogene TLR-2 Liganden T-Zelleffektorfunktionen beeinflussen, und um somit den möglichen Beitrag dieser Liganden zur Pathogenese der

atopischen Dermatitis ableiten zu können, wurden als klassische Staphylokokken-Komponenten Lipoteichonsäure (LTA) und zweifach acetylierte Lipopeptide (MALP-2)⁽¹³⁵⁾ zur Stimulation von T-Zellen eingesetzt. Vorher jedoch musste der Einfluss auf die TLR-2 Expression selbst nach Stimulation von aktivierten CD4⁺ T-Zellen analysiert werden. Dabei stellte sich heraus, dass in Anwesenheit von LTA nur noch 40% der CD4⁺ T-Zellen TLR-2 exprimierten, während die Rezeptorexpression nach MALP-2 Stimulation unverändert blieb [Abb.26A]. Da der Anteil aktivierter CD25^{pos} T-Zellen nach LTA-Stimulation mit dem Anteil aus dem entsprechenden TLR-2 unstimulierten Ansatz übereinstimmte [Abb.26B], erscheint es möglich, dass dieser spezielle Ligand zu einem Verlust des Rezeptors bei einem Teil der aktivierten CD25^{pos} T-Zellen führte. Dies könnte durch Induktion eines proteolytischen Degradationsvorgangs nach Ubiquitinierung bedingt sein.⁽¹³⁶⁾ Erst kürzlich konnte Triad3A als für die Degradation von TLR-4 und TLR-9 verantwortliches Molekül identifiziert werden, das nach Bindung an die zytoplasmatische Domäne der Rezeptoren deren Ubiquitinierung induziert.⁽¹³⁷⁾ Allerdings ist bis heute unklar, welches Molekül die Degradation von TLR-2 vermittelt. In einigen Studien konnte die Beteiligung des aus *S. aureus* isolierten LTAs im Zusammenhang mit Sepsis berichtet werden.⁽¹³⁸⁾ Insofern könnte LTA ein derart potenter Aktivator proinflammatorischer Zytokine sein, dass es möglicherweise selbst durch Induktion eines TLR-2 degradierenden Enzyms das Ausmaß der Entzündung reguliert. Im Hinblick auf das noch unbekannte TLR-2 abbauende Enzym könnte dieses eventuell durch LTA selbst stark hochreguliert sein und somit unter diesen Umständen dessen Nachweis erleichtern.

Des weiteren machte die durch LTA bedingte reduzierte TLR-2 Expression eine Analyse des TLR-2 Expressionsprofils auf mRNA Ebene erforderlich. In Diskrepanz zu den durchflusszytometrischen Daten führte die LTA-Stimulation im Vergleich zu den TLR-2 unstimulierten T-Zellen nicht zu einer drastischen Reduktion an TLR-2 Transkripten. Stattdessen war selbst direkt nach Aufreinigung eine deutliche TLR-2 Expression festzustellen [Abb.27]. Ob TLR-2 Protein bereits vor CD3/CD28 Aktivierung intrazellulär vorlag und erst nach einer vollständigen T-Zellaktivierung an die Oberfläche transportiert wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht. Dafür aber konnte erstmalig eine konstitutive Präsenz von TLR-6 Transkripten in CD4⁺ T-Zellen nach Aufreinigung sowie nach CD3/CD28 Aktivierung in An- bzw. Abwesenheit der TLR-2 Liganden gezeigt werden [Abb.27]. Damit besteht zumindest theoretisch die Möglichkeit, dass T-Zellen direkt durch MALP-2 stimuliert werden können. Zur Beantwortung der primären Frage, ob staphylogene Komponenten nun T-Zelleffektorfunktionen direkt

beeinflussen, wurden die klassischen T_H1 und T_H2 Zytokine (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5 und IL-10) in den Kulturüberständen der mit LTA bzw. MALP-2 stimulierten $CD4^+$ T-Zellen bestimmt. Während LTA die Synthese von keinem Zytokin zusätzlich induzieren konnte, so hatte die MALP-2 Stimulation im Vergleich zu den TLR-2 unstimulierten Ansätzen eine verstärkte und dosisabhängige Produktion von T_H1 -Zytokinen zur Folge, die durch ein 3-fach erhöhtes IFN- γ , 5-fach erhöhtes TNF- α , sowie durch ein 12-fach erhöhtes IL-2 charakterisiert war [Abb.28]. Gleichzeitig bestätigte diese verstärkte Zytokinsynthese die Präsenz eines funktionellen TLR-6 in $CD4^+$ T-Zellen. Auf mRNA Ebene spiegelte sich das mit MALP-2 assoziierte T_H1 -Zytokinprofil nur partiell wider. So war die relative Expression des T_H1 -dirigierenden Transkriptionsfaktors t-bet nach MALP-2 Stimulation nicht signifikant erhöht, dafür kam es aber zu einer deutlichen Reduktion des T_H2 -dirigierenden Transkriptionsfaktors GATA-3 [Abb.29]. Zusammen mit der erhöhten relativen Expression von IL-2 [Abb.30] kann man dennoch mehr von einem T_H1 -Charakter des MALP-2 ausgehen. Gestützt wird dies durch eine kürzlich publizierte Arbeit von Weigt et al., in der das Potential von MALP-2 zur Umkehrung eines bereits bestehenden T_H2 -Phänotyps in Richtung T_H1 aufgrund massiver IFN- γ Sekretion beschrieben ist.⁽¹³⁹⁾

Dass $CD4^+$ T-Zellen grundsätzlich nicht auf LTA reagierten, könnte zwei Gründe haben. Einerseits könnte hierfür die reduzierte TLR-2 Expression nach LTA-Stimulation verantwortlich sein, zumal in dieser Arbeit bereits eine direkte Relation zwischen Rezeptordichte und Aktivierungsgrad gezeigt wurde. Die andere Möglichkeit könnte mit dem Fehlen von CD36 in $CD4^+$ T-Zellen zusammenhängen. Erst seit Kurzem ist bekannt, dass neben TLR-2 auch CD36 für eine optimale Erkennung der Lipoteichonsäure benötigt wird, da CD36 defiziente Makrophagen nach LTA-Stimulation nicht zur Zytokinsynthese imstande waren.⁽¹⁴⁰⁾ Da zudem die LTA-Antwort von TLR-6 defizienten Fibroblasten erheblich gestört war, wurde auch die Notwendigkeit von TLR-6⁽¹⁴¹⁾ postuliert. Letzteres wäre jedoch unseren Daten zufolge eindeutig auszuschließen, da LTA im Vergleich zu MALP-2 ein differentielles Zytokinsekretionsprofil zeigte.

Da das lymphozytäre Infiltrat der Dermis in der atopischen Dermatitis eine Prädominanz von aktivierten Memory T-Zellen zeigt⁽¹³⁾, sollten diese nach den hier dargestellten Ergebnissen auch durch eine TLR-2 und TLR-6 Expression charakterisiert sein. Die funktionelle Relevanz der durch staphylogene Lipopeptide (MALP-2) und über TLR-2/6 vermittelten T-Zellaktivierung könnte einen wesentlichen Pathomechanismus darstellen, der aufgrund der T_H1 -favorisierenden Eigenschaften dieses Liganden erheblich zur

Chronifizierung des Ekzems beitragen könnte. Durch die verstärkte IFN- γ Synthese könnte so auch in nichtprofessionellen antigenpräsentierenden Zellen, wie die Keratinozyten, die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen sowie zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, u. a. TNF- α induziert werden, wodurch der entzündliche Infiltrationsprozeß gefördert würde.⁽¹⁴²⁾ Das durch MALP-2 induzierte TNF- α könnte ferner das Fas-Molekül auf den Keratinozyten hochregulieren⁽⁴⁹⁾ und nach Interaktion mit dem auf aktivierten T-Zellen vorhandenen Fas-Liganden die Apoptose von Keratinozyten und damit die Auflösung spezifischer Haftstrukturen einleiten, die zur typischen Auflockerung des Epithelverbandes bei Ekzemen führt.⁽⁴⁹⁾ Wie aus unseren Daten auch ersichtlich wurde, tragen staphylogene Zellwandbestandteile nicht zur initialen T-Zellaktivierung bei, sondern können erst auf aktivierten T-Zellen nach Induktion der TLR-2 Expression wirken. Allerdings könnten sie fortan den Aktivierungsstatus der Zellen dauerhaft aufrecht erhalten, indem das hierdurch induzierte IL-2 in einem autokrinen Mechanismus an den IL-2 Rezeptor bindet (CD25 entspricht der α -Kette dieses Rezeptors) und damit zur weiteren T-Zellaktivierung beiträgt. Dass der Aktivierungsgrad der CD4⁺ Population mit der Schwere der Erkrankung korreliert, ist bereits bekannt.⁽³⁶⁾ Dennoch bleibt zu berücksichtigen, dass die hier dargestellten In-vitro Daten nicht die komplette Bakterien-Situation wiedergeben. So bleibt offen, ob staphylogene Lipopeptide bei gleichzeitiger Anwesenheit von Lipoteichonsäure ebenso uneingeschränkt die selben Effekte induzieren oder durch LTA bzw. andere bakterielle Komponenten moduliert werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der atopischen Dermatitis handelt es sich um eine chronisch entzündliche und durch Juckreiz gekennzeichnete Dermatose, die in Assoziation mit einer erhöhten IgE-Synthese steht. Neben der erblichen Disposition umfassen die Pathomechanismen primär Störungen der Hautbarrierefunktion sowie eine dysregulierte Immunantwort. Zusätzlich wird der Verlauf der Erkrankung durch exogene Faktoren erschwert, wobei sich insbesondere die kutane *Staphylococcus aureus* Besiedlung als entscheidender Pathogenitätsfaktor herausgestellt hat. So sind mehr als 80% der AD Patienten von einer derartigen bakteriellen Besiedlung betroffen. Besonders Superantigen-produzierende *S. aureus* Stämme tragen durch massive T-Zellaktivierung sowie durch Induktion einer spezifischen Immunantwort erheblich zur Exazerbation des Krankheitsbildes bei. Bis heute ist jedoch unklar, inwiefern Störungen des adaptiven Immunsystems eine mangelnde Protektion gegenüber diesen Keimen bedingen. Da bakterielle Infektionen häufig auch mit einer IgG-Subklassendefizienz einhergehen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern das Fehlen oder die eingeschränkte Produktion bestimmter IgG-Subklassen für die *S. aureus* Besiedlung verantwortlich sein könnten. Dabei zeigten sich anstelle einer Defizienz erhöhte IgG1 und IgG4 Titer im Serum der mit *S. aureus* besiedelten Patienten, die als Folge der ständigen Konfrontation mit den Bakterien zu deuten war und aufgrund der über dem Verhältnis hinaus produzierten Menge eher an der Entzündung als in der Protektion beteiligt sein könnten. Auf die Frage, ob eine gestörte humorale Immunität gegenüber staphylogenen Superantigenen in der atopischen Dermatitis besteht, wurde das SEC1 spezifische IgG-Subklassenprofil quantitativ ermittelt, da bei den untersuchten Patienten eine auffällige Besiedlung mit SEC1-sezernierenden *S. aureus* Stämmen festgestellt wurde. Tatsächlich bestand bei 40% der Patienten eine SEC1 spezifische IgG2 Defizienz bei sonst normaler IgG2 Synthese, die allerdings weder mit dem bakteriellen Besiedlungsstatus noch mit SEC1 spezifischen IgE-Titern korrelierte. Allerdings sezernierten nur PBMCs der α -SEC1 IgG2 defizienten Patienten IL-4 und IL-5 nach SEC1-Restimulation, was auf die Präsenz von SEC1 spezifischen T_H2 -Zellen hindeutete. Dies könnte auf der Eigenschaft des Superantigens selbst beruhen, lediglich T-Zellen mit BV8S2 Elementen des T-Zellrezeptors zu aktivieren, zu denen vor allem NKT Zellen als Hauptproduzenten von IL-4 zählen. Unter diesen Bedingungen könnte somit ein spezielles T_H2 -Mikromilieu geschaffen werden, wodurch selektiv die Synthese SEC1 spezifischer IgG2 Antikörper unterbunden wird. Patienten mit α -SEC1 IgG2 Defizienz zeigten ferner eine besonders schwere

Verlaufsform des Ekzems. Dennoch bedingten quantitative Unterschiede im Superantigen-spezifischen IgG-Profil nicht die mangelnde Protektion gegenüber den Toxinen. Stattdessen stellte sich heraus, dass SEC1 spezifische IgG-Antikörper das entsprechende Toxin weniger effizient neutralisierten, so dass eine unzureichende Protektion gegenüber den Superantigenen, zumindest für SEC1, auf eine eingeschränkte funktionelle Kapazität der entsprechenden IgG-Antikörper zurückzuführen ist. Neben einer fehlgesteuerten adaptiven Immunantwort könnten außerdem Störungen innerhalb angeborener Abwehrmechanismen für die Suszeptibilität zu *S. aureus* verantwortlich sein. Im Rahmen dieser Arbeit konnten 11.5% der AD Patienten als heterozygote Träger der TLR-2 R753Q Punktmutation identifiziert werden, die ursprünglich mit einer erhöhten Inzidenz zur *S. aureus* Infektion assoziiert wurde. Die nähere Charakterisierung dieser Patientengruppe zeigte ein 55%-iges Risiko zur kutanen *S. aureus* Besiedlung, eine schwere Verlaufsform der AD sowie die höchsten IgE-Titer, wobei letzteres auf eine verstärkte T_H2-Antwort hinweist. Da die TLR-2 R753Q Punktmutation als neuer Pathogenitätsfaktor in der atopischen Dermatitis identifiziert wurde, sollte durch Transfektion eines 50:50 Gemisch des Wildtyp und des generierten mutierten R753Q TLR-2 Konstrukts in HEK293 Zellen die heterozygote Mutation simuliert werden, um deren funktionelle Relevanz in-vitro zu analysieren. Nachdem hierfür eine dosisabhängige TLR-2 vermittelte Antwort erstmalig bestätigt wurde, konnte anhand dieses Transfektionssystems eine bis zu 40% beeinträchtigte IL-8 Sekretion der heterozygoten R753Q Transfektanten nach Stimulation mit hitzeinaktiviertem *S. aureus* gezeigt werden. Dass 55% der Mutationsträger zur Staphylokokken-Besiedlung neigten, könnte mit der verminderten IL-8 Sekretion und damit der beeinträchtigten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zusammenhängen. Neben dem Aspekt der fehlgesteuerten Abwehrmechanismen in der atopischen Dermatitis herrscht ebenso Unklarheit darüber, inwiefern staphylogene Komponenten in der Pathogenese involviert sind. Aufgrund der massiven Infiltration von CD4⁺ T-Zellen in die Haut wäre eine direkte, über TLR-2 vermittelte Interaktion zwischen diesen bakteriellen Komponenten und den T-Zellen denkbar. Tatsächlich konnte bei nicht-atopischen Spendern eine deutliche TLR-2 Expression auf der Oberfläche von CD4⁺ T-Zellen nach T-Zellaktivierung nachgewiesen werden. Die Stimulation mit Lipoteichonsäure führte allerdings zu einer signifikanten Reduktion des Rezeptors einhergehend mit einem den TLR-2 unstimulierten T-Zellen vergleichbaren Zytokinprofil. Dahingegen hatte die MALP-2 Stimulation im Vergleich zu den TLR-2 unstimulierten Ansätzen eine verstärkte und dosisabhängige Antwort der T_H1-Zytokine (IL-2, TNF- α und IFN- γ) zur Folge. Demnach können einige staphylogene

Komponenten direkt mit T-Zellen über TLR-2 interagieren und durch Induktion proinflammatorischer Zytokine zusätzlich zur Entzündung und zur Chronifizierung des Ekzems beitragen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ring J (Hrsg). Angewandte Allergologie. MMV München 1988; 2. Auflage ; S. :27
2. Schultz Larsen F, Diepgen T, Svensson A. The occurrence of atopic dermatitis in north Europe: an international questionnaire study. *J Am Acad Dermatol* 1996;34(5):760-4
3. Williams H, Robertson C, Stewart A, Ait-Khaled N, et al. Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:125-38
4. Martinez FD. The coming-of-age of the hygiene hypothesis. *Respir Res* 2001;2(3):129-32
5. Alm JS, Schwartz J, Lilja G, Scheynius A, et al. Atopy in children of families with antroposophic lifestyle. *Lancet* 1999; 353:1485-8
6. Murosaki S, Yamamoto Y, Ito K, Inokuchi T, et al. Heatkilled *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IgE production. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:57-64
7. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH. Dermatitis und Ekzemerkrankungen, atopisches Ekzem. In: "Dermatologie und Venerologie". Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996; 4. Auflage ; S.448-50
8. Cookson WO, Young RP, Sandford AJ, Moffatt MF, et al. Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11q. *Lancet* 1992; 340(8816):381-4
9. Forrest S, Dunn K, Elliott K, et al. Identifying genes predisposing to atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1066-70
10. Kawashima T, Noguchi E, Arinami T, et al. Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. *J Med Genet* 1998; 35:502-4
11. Hanifin J und Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derma Venerol* 1980;92(92):44-47
12. Leung DYM, Bhan AK, Schneeberger EE, Geha RS. Characterization of the mononuclear cell infiltrate in atopic dermatitis using monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 71:47-56
13. Bos JD, Hagenara C, Das PK, Krieg SR, et al. Predominance of „memory“ T cells over „naïve “ T cells in both normal and diseased human skin. *Arch Dermatol Res* 1989; 81:24-30
14. Leung DYM und Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet* 2003;361:151-60
15. Imayama S, Hashizume T, Miyahara H, Tanahashi T, et al. Combination of patch test and IgE for dust mite antigens differentiates 130 patients with atopic dermatitis into four groups. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27:531-8
16. Abbas AK, Lichtman AH und Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. Saunders Text and Review series 1997; 3.Auflage
17. Basson MA und Zamoyska R. The CD4/CD8 lineage decision: integration of signalling pathways. *Immunol Today* 2000; 21:509-14
18. Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V und Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* 2001; 2:585-9
19. Bour H, Peyron E, Goucherand M, Garigue JL, et al. Major histocompatibility complexes class I-restricted CD8(+) T cells and class II-restricted CD4(+) T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol* 1995; 25 :3006-10

20. Linsley PS, Clark EA und Ledbetter JA. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:5031-35
21. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, et al. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 1991; 173:721-30
22. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cell clone I: definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136(7):2348-57
23. Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, et al. Reciprocal regulatory effects of IFN- γ and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 1992; 148:2142-7
24. O'Garra. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998; 8: 275-83
25. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383(6603):787-93
26. Constant S und Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:297-322
27. Constant S, Pfeiffer C, Woodard A, Pasqualini T, et al. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med* 1995; 182:1591-6
28. Magram J, Connaughton SE, Warrier RR, Carvajal DM, et al. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 1996;4:471-81
29. Klyczek KK, Murasko DM, Blank KJ. Interferon- γ and Interferon- α/β and tumor necrosis factor differently affect major histocompatibility complex class I expression in murine leukemia Virus-induced tumor cell lines. *J Immunol* 1987; 139:2641-8
30. Gajewski TF und Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN- γ in immune regulation. *J Immunol* 1988; 140:4245-52
31. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annual Rev Immunol* 1994, 12:227-57
32. Vercelli D, Jahara HH, Arai KI, Geha RS. Induction of human IgE synthesis requires Interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD23 complex and MHC class II antigens. *J Exp Med* 1989; 169:1295-1307
33. De Vries IJM, Langeveld-Wildschut EG, van Reijsen EC, Dubois GR, et al. Adhesion molecule expression on skin endothelia in atopic dermatitis: Effects of TNF- α and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:461-8
34. Woodward AL, Spergel JM, Alenius H, Mizoguchi E, et al. An obligate role for T-cell receptor $\alpha\beta$ + T cells but not T-cell receptor $\gamma\delta$ + T cells, B cells or CD40/CD40L interactions in a mouse model of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:359-66
35. Leung DYM, Wood N, Dubey D, Rhodes AR. Cellular basis of defective cell-mediated lympholysis in atopic dermatitis. *J Immunol* 1983; 130:1678-82
36. Walker C, Kägi MK, Ingold P, Braun P, et al. Atopic dermatitis: correlation of peripheral blood T cell activation, eosinophilia and serum factors with clinical severity. *Clin Exp Allergy* 1992; 23:145-53

37. Santamaria Babi LF, Picker LJ, Perez Soler MT, et al. Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J Exp Med* 1995; 181:1935-40
38. Hwang ST. mechanism of T-cell homing to skin. *Adv Dermatol* 2001; 17:211-41
39. van Reijssen FC, Bruijnzeel-Koomen CA, Kalthoff FS, et al. Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90:184-93
40. Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T. Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 1996; 106:446-53
41. Engering AJ, Cella M, Fluitsma D, Brockhaus M, et al. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997; 27(9):2417-25
42. Mudde GC, van Reijssen FC, Boland GJ, de Gast GC, et al. Allergen presentation by epidermal Langerhans' cells from patients with atopic dermatitis is mediated by IgE. *Immunology* 1990; 69:335-41
43. Ring J und Behrendt H. Allergy and IgE production: Role of infection and environmental pollution? *Allergo J* 1993; 2:27-30
44. Ohki O, Yokozeki H, Katayama I, Umeda T, et al. Functional CD86 (B7-2/B70) is predominantly expressed on Langerhans cells in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1997; 136:838-45
45. Meng H, Marchese MJ, Garlick JA, Jelaska A, et al. Mast cells induce T-cell adhesion to human fibroblasts by regulating intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression. *J Invest Dermatol* 1995; 105:789-96
46. Yawalkar N, Uguccioni M, Scharer J, Braunwalder J, et al. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1999; 113:43-8
47. Juhlin L und Venge P. Eosinophilic cationic protein (ECP) in skin disorders. *Acta Derm Venerol* 1991; 71:495-501
48. Breuer K, Kapp A, Werfel T. Urine eosinophil protein X (EPX) is an in vitro parameter of inflammation in atopic dermatitis of the adult age. *Allergy* 2001; 56:780-4
49. Trautmann A, Akdis M, Schmid-Grendelmeier P, Disch R, et al. Targeting keratinocyte apoptosis in the treatment of atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:839-46
50. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002; 347(15):1151-60
51. Nomura I, Goleva E, Howell MD, et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* 2003;171(6): 3262-9.
52. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CA, Schopf E, Thepen T, et al. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 1998; 19:359-61
53. Chan LS, Robinson N und Xu L. Expression of interleukin-4 in the epidermis of transgenic mice results in a pruritic inflammatory skin disease: an experimental animal model to study atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2001; 117:977-83
54. Spergel JM, Mizoguchi E, Oettgen H, Bhan AK, et al. Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. *J Clin Invest* 1999; 103:1103-11

55. Jujo K, Renz H, Abe J, Gelfand EW, et al. Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis. *J Allergy Clin Immunol* 1992 ;90(3):323-31
56. Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, Biswas P, et al. Allergen and bacterial antigen specific T cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Nat Acad Sci* 1991; 88:4538-42
57. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002; 3:673-80
58. Wedi B, Raap U, Lewrick H, Kapp A. Delayed eosinophil programmed cell death in vitro: a common feature of inhalant allergy and extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:536-43
59. Grewe M, Czech W, Morita A, Werfel T, et al. Human eosinophils produce biologically active IL-12: implications for control of T cell responses. *J Immunol* 1998; 161:415-20
60. Werfel T, Morita A, Grewe M, Renz H, et al. Allergen specificity of skin infiltrating T cells is not restricted to a type 2 cytokine pattern in chronic skin lesions of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1996; 107(6):871-6
61. Brzoska T und Luger TA. Murine Models of Atopic Dermatitis. In: *Animal Models of T Cell Mediated Skin Diseases*. Heidelberg: Springer Verlag, 2005:133-66
62. Leyden JE, Marples RR, Kligman AM. *Staphylococcus aureus* in the lesions of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1974; 90:525-30
63. Williams RE, Gibson AG, Aitchison TC, et al. Assessment of a contact-plate sampling technique and subsequent quantitative bacterial studies in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1990;123(4):493-501
64. Bunikowski R, Mielke ME, Skarabis H, Worm M, et al. Evidence for a disease-promoting effect of *Staphylococcus aureus*-derived exotoxins in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:814-9
65. Cho SH, Strickland I, Tomkinson A, Fehring AP, et al. Preferential binding of *Staphylococcus aureus* to skin sites of Th2-mediated inflammation in a murine model. *J Invest Dermatol* 2001; 116:658-63
66. Cho SH, Strickland I, Boguniewicz M, Leung DY. Fibronectin and fibrinogen contribute to the enhanced binding of *Staphylococcus aureus* to atopic skin. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:269-74
67. Lever R, Hadley K, Downey D, Mackie R. Staphylococcal colonization in atopic dermatitis and the effect of topical mupirocin therapy. *Br J Dermatol* 1988;119:189-98
68. McFadden JP, Noble WC, Camp RD, Michie CA, Davis T. Superantigenic exotoxin-secreting potential of staphylococci isolated from atopic eczematous skin. *Br J Dermatol* 1993;128(6):631-2
69. Dellabona P, Peccoud J, Kappler J, Marrack P, et al. Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell* 1990;62:1115-21
70. Marrack P und Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990;248:705-11
71. Strickland I, Hauck PJ, Trumble A, Picker LJ, et al. Evidence for superantigen involvement in skin homing of T cells in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1999; 112:249-53
72. Ha SJ, Lee HJ, Byun DG, Kim JW. Expression of T cell receptor Vb chains in lesional skin of atopic dermatitis. *Acta Dermatol Venerol Stockh* 1998; 78:424-7

73. Strange P, Skov L, Lisby S, Nielsen PL, et al. Staphylococcal enterotoxin B applied on intact normal and intact atopic skin induces dermatitis. *Arch Dermatol* 1996;132:27-33
74. Neuber K, Steinrücke K und Ring J. Staphylococcal enterotoxin B affects in vitro IgE synthesis, interferon- γ , Interleukin-4 and Interleukin-5 production in atopic eczema. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107:179-82
75. Bright JJ, Xin Z, Siram S. Superantigens augment antigen-specific Th1 responses by inducing IL-12 production in macrophages. *J Leukoc Biol* 1999; 65:665-70
76. Leung DYM, Harbeck R, Bina P, Reiser E, et al. Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. *J Clin Invest* 1993; 92:1374-80
77. Breuer K, Wittmann M, Bosche B, Kapp A, Werfel T. Severe atopic dermatitis is associated with sensitization to staphylococcal enterotoxin B (SEB). *Allergy* 2000;55(6):551-5
78. Bunikowski R, Mielke M, Skarabis H, et al. Prevalence and role of serum IgE antibodies to the Staphylococcus aureus-derived superantigens SEA and SEB in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(1 Pt 1):119-24
79. Leung DYM, Huber B, Schlievert P (eds). Superantigens: Structure, biology and relevance to human disease. New York: Marcel Dekker, 1997:1-593
80. Hashimoto C, Hudson KL und Anderson KV. The Toll gene of Drosophila, required for dorso-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52:269-79
81. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:13-9
82. Medzhitov R und Janeway CA. Innate immunity. the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91:295-8
83. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97(25):13766-71
84. Dunne A und O'Neill LAJ. Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Letters* 2005; 579:3330-5
85. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signalling pathways. *Mol Cell* 1998;2:253-8
86. Kopp E, Medzhitov R, Carothers J, Xiao C, et al. ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev* 1999; 13:2059-71
87. Horng T, Barton GM, Flavell RA und Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signal specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002; 420(6913):329-33
88. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88 independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001; 167(10):5887-94
89. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, et al. Cutting Edge: A novel Toll/IL-1 Receptor Domain Containing Adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signalling. *J Immunol* 2002; 169(12):6668-72
90. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4:1144-50

91. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, et al. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274:17406-17409
92. Mitsuzawa H, Wada I, Sano H, Iwaki D, et al. Extracellular Toll-like receptor 2 region containing Ser40-Ile64 but not Cys30-Ser39 is critical for the recognition of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan. *J Biol Chem* 2001; 276:41350-41356
93. Pivarcsi A, Bodai L, Rethi B, Kenderessy-Szabo A, et al. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *International Immunology* 2003; 15(6):721-30
94. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 2000;165(10):5392-6
95. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 2000;68(11):6398-401
96. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999; 285:732-6
97. Akdis CA, Kussebi F, Pulendran B, Akdis M, et al. Inhibition of T helper 2-type responses, IgE production and eosinophilia by synthetic lipopeptides. *Eur J Immunol* 2003; 33:2717-26
98. Re F und Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* 2001;276(40):37692-9
99. Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, et al. Cutting edge: Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via different modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 2003;171:4984-9
100. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, et al. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest* 2002;109:1351-9
101. Redecke V, Hacker H, Datta SK, Fermin A, et al. Cutting edge: Activation of toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 2004;172(5):2739-43
102. Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzaheh M, et al. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* 2001; 167:5067-76
103. Stalder JF, Taieb A, Atherton DJ, et al. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 1993;186(1):23-31.
104. Kunz B, Oranje AP, Labreze L, Staldor JF, et al. Clinical validation and guidelines for the SCORAD index: Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 1997; 189:10-9
105. Kang TJ und Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001;31(1):53-8
106. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002;162(9):1028-32
107. Schröder NWJ, Morath S, Alexander C, Hamann L, et al. Lipoteichoic acid (LTA) of *S. Pneumoniae* and *S. aureus* activates immune cells via Toll-like Receptor (TLR)-2, Lipopolysaccharide (LPS) Binding Protein (LBP) and CD14 while TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 2003; 278(18):15587-94

108. Gabrielsen T und Brandtzaeg P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for isotype-specific quantitation of antibodies to *Staphylococcus aureus* in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venerol* (Stockh) 1985; 114:61-6
109. Morell A. IgG subclass deficiency: a personal viewpoint. *Pediatr Infect Dis J* 1990; 9:S4-S8
110. Hamilton RG. Human IgG subclass measurements in the clinic laboratory. *Clin Chem* 1987; 33(10):1707-25
111. Aalberse RC, van der Gaag R, van Leeuwen J. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *J Immunol* 1983; 130:722-6
112. Zollner TM, Nuber V, Duijvestijn AM, Boehncke WH, et al. Superantigens but not mitogens are capable of inducing upregulation of E-selectin ligands on human T lymphocytes. *Exp Dermatol* 1997; 6:161-66
113. Bonventre PF, Linnemann C, Weckbach LS, Staneck JL, et al. Antibody responses to toxic-shock-syndrome (TSS) toxin by patients with TSS and by healthy staphylococcal carriers. *J Infect Dis* 1984; 150:662
114. Campbell DE, Kemp AS. Production of antibodies to staphylococcal superantigens in atopic dermatitis. *Arch Dis Child* 1998;79(5):400-4.
115. Siber GR, Schur PH, Aisenberg AC, Weitzman SA, Schiffman G. Correlation between serum IgG 2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *N Engl J Med* 1980;303(4):178-82
116. Bredius RG, de Vries CE, Troelstra A, et al. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* type B opsonized with polyclonal human IgG1 and IgG2 antibodies. Functional hFc gamma RIIa polymorphism to IgG2. *J Immunol* 1993;151(3):1463-72
117. Epstein MM, Gruskay F. Selective deficiency in pneumococcal antibody response in children with recurrent infections. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;75(2):125-31
118. Persson MA, Brown SE, Steward MW, et al. IgG subclass-associated affinity differences of specific antibodies in humans. *J Immunol* 1988;140:3875-79
119. Pan Q, Hammarstrom L. Molecular basis of IgG subclass deficiency. *Immunol Rev* 2000;178:99-110
120. Kawano Y, Noma T, Yata J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *J Immunol* 1994;153(11):4948-58
121. Yoshioka T, Hikita I, Matsutani T, et al. DS-Nh as an experimental model of atopic dermatitis induced by *Staphylococcus aureus* producing staphylococcal enterotoxin C. *Immunology* 2003;108(4):562-9
122. Bendelac A, Hunziker RD, Lantz O. Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells. *J Exp Med* 1996;184:1285-93
123. Chi YI, Sadler I, Jablonski LM, et al. Zinc-mediated dimerization and its effect on activity and conformation of staphylococcal enterotoxin type C. *J Biol Chem* 2002;277(25):22839-46
124. Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, et al. The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J* 2004; 23:219-23
125. Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001;31(1):53-8
126. Schröder NWJ, Hermann C, Hamann L, et al. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. *J Mol Med* 2003;81:368-72

127. Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, et al. Saccharomyces cerevisiae- and Candida albicans-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. Microbiol Immunol 2002; 46:503-12
128. Savolainen J, Lammintausta K, Kalimo K, Viander M. Candida albicans and atopic dermatitis. Clin Exp Allergy 1993; 23:332-9
129. Netea MG, van der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, et al. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. J Infect Dis 2002; 185(10):1483-9
130. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. J Allergy Clin Immunol 2004;113:482-8
131. Dabbagh K, Dahl ME, Stepick-Biek P und Lewis DB. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 responses: role of dendritic cells. J Immunol 2002; 168:4524-30
132. von Aulock S, Schröder NW, Traub S, Gueinzius K, et al. Heterozygous toll-like receptor 2 polymorphism does not affect lipoteichoic acid-induced chemokine and inflammatory responses. Infect Immun 2004;72(3):1828-31
133. Breuer K, Wittmann M, Kempe K, Kapp A, et al. Alpha-toxin is produced by skin colonizing Staphylococcus aureus and induces a T helper type 1 response in atopic dermatitis. Clin Exp Allergy 2005; 35(8):1088-95
134. Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew FY. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. PNAS 2004; 101: 3029-34
135. Hashimoto M, Tawaratsumida K, Kariya H, Aoyama K, et al. Lipoprotein is a predominant Toll-like receptor 2 ligand in Staphylococcus aureus cell wall components. International Immunology 2005; 18(2):355-62
136. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. Annu Rev Biochem 2001; 70:503-33
137. Chuang TH und Ulevitch RJ. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. Nature Immunol 2004; 5:495-502
138. Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, et al. Mechanisms of gram-positive shock : identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock and multiple organ failure. J Exp Med 1998; 188:305-15
139. Weigt H, Muhlradt PF, Larbig M, Krug N, et al. The Toll-like receptor-2/6 agonist macrophage-activating lipopeptide-2 cooperates with IFN-γ to reverse the Th2 skew in an in vitro allergy model. J Immunol 2004; 172:6080-86
140. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. Nature 2005; 433: 523-7
141. Morr M, Takeuchi O, Akira S, Simon MM, et al. Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. Eur J Immunol 2002; 32:3337-47
142. Strange P, Skov L, Baadsgaard O. Interferon gamma-treated keratinocytes activate T cells in the presence of superantigens: involvement of major histocompatibility complex II molecules. J Invest Dermatol 1994; 102:150-4

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AD	Atopische Dermatitis
AP-1	Aktivator-Protein -1
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster Differentiation
cDNA	complementary DNA
CLA	Cutaneous Lymphocyte Antigen
cpm	counts per minute
DC	Dendritische Zelle
Der p	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
d.h.	das heißt
dNTP	desoxy-Nukleotid-5'-triphosphate
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
ECP	Eosinophilic Cationic Protein
ECSIT	evolutionary conserved intermediate in Toll pathway
ELISA	Enzyme Linked Immuno Assay
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	Fötales Kälber Serum
FcγR	Fc gamma Rezeptor
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FRET	fluorescence resonance energy transfer
FSC	forward scatter
HEK293	human embryonic kidney cells
HRPO	Horseraddish Peroxidase
IFN-γ	Interferon gamma
Ig (A,D,E,G,M)	Immunglobulin der Klasse (A,D,E,G,M)
IκB	Inhibitor of NFκB
IL	Interleukin
IP-10	interferon γ inducible protein-10
IRF3	IFN regulatory factor 3
IRAK	interleukin-1 receptor associated kinase

kU/L	kiloUnit pro Liter
LTA	lipoteichoic acid
MALP-2	Macrophage-activating lipopeptide 2
MBP	Major basic protein
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NFκB	Nukleärer Faktor kappa B
NKT	Natürliche Killer T-Zelle
OD	Optische Dichte
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PE	Phycoerythrin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PBS	Phosphate buffered saline
PRR	pattern recognition receptor
rpm	rounds per minute
RPMI	Zellkulturmedium entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription
SEB/SEC1	Staphylokokken-Enterotoxin B/C1
SNP	single nucleotide polymorphism
SSC	sideward scatter
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor
T_H1/2	T-Helfer-Zelle Typ 1/2
TIR	Toll/IL-1R
TIRAP	TIR domain containing adapter protein
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TLR	Toll-like Rezeptor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRAF6	TNFR assoziierter Faktor 6
TRIF	TIR domain containing adapter inducing IFN- β
u. a.	unter anderem
V	Volt

8. PUBLIKATIONEN

- **Mrabet-Dahbi S***, Ahmad-Nejad P*, Breuer K, Klotz M, Werfel T, Herz U, Heeg K, Neumaier M and Renz H. The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. J Allergy Clin Immunol 2004; 113(3):565-7 (*) : geteilte Erstautorenschaft
- **Mrabet-Dahbi S**, Breuer K, Klotz M, Herz U, Heeg K, Werfel T and Renz H. Deficiency in immunoglobulin G2 antibodies against staphylococcal enterotoxin C1 defines a subgroup of patients with atopic dermatitis. Clin Exp Allergy 2005; 35(3):274-81
- Breuer K, Wittmann M, Kempe K, Kapp A, Mai U, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, **Mrabet-Dahbi S** and Werfel T. Alpha-toxin is produced by skin colonizing *Staphylococcus aureus* and induces a T helper type 1 response in atopic dermatitis. Clin Exp Allergy 2005; 35(8):1088-95
- **Mrabet-Dahbi S** and Renz H. Role of inhalant allergens in atopic dermatitis. Chapter 9. Taylor & Francis Medical Books. Abingdon: in Druck

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bisher als Vorträge auf nationalen und internationalen Kongressen der DGAI (Deutsche Gesellschaft für Allergie und Immunologie) und der EAACI (European Academy of Allergology and Clinical Immunology) vorgestellt:

- **Mrabet-Dahbi S**, Breuer K, Klotz M, Heeg K, Renz H, Werfel T, Herz U. Produktion von Superantigen-spezifischen Antikörpern bei der atopischen Dermatitis. 15. Mainzer Allergie-Workshop. Allergo Journal 2003; vol.12:55
- **Mrabet-Dahbi S**, Breuer K, Klotz M, Heeg K, Renz H, Werfel T, Herz U. Lack of specific IgG2 antibodies against SEB/SEC define a subgroup of patients with atopic dermatitis. XXIIth Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology in Paris. Allergy 2003; vol.58:Supplement 74
- **Mrabet-Dahbi S**, Breuer K, Klotz M, Heeg K, Herz U, Werfel T, Renz H. Die SEC1 spezifische IgG2 Defizienz korreliert mit dem Schweregrad der atopischen Dermatitis. 16. Mainzer Allergie-Workshop. Allergo Journal 2004; vol.13:48

- **Mrabet-Dahbi S**, Ahmad-Nejad P, Breuer K, Klotz M, Herz H, Heeg K, Werfel T, Neumaier M, Renz H. The Toll-Like Receptor (TLR)-2 R753Q polymorphism defines a subgroup of atopic dermatitis patients with severe phenotype. XXIIIrd Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2004 in Amsterdam
- **Mrabet-Dahbi S**, Ahmad-Nejad P, Breuer K, Klotz M, Herz H, Heeg K, Werfel T, Neumaier M, Renz H. Der Toll-like Rezeptor-2 R753Q Polymorphismus ist mit einem schweren Phänotyp der atopischen Dermatitis assoziiert. 17. Mainzer Allergie-Workshop Allergo Journal 2005; vol.14:43
- **Mrabet-Dahbi S**, Niebuhr M, Breuer K, Ahmad-Nejad P, Dalpke A, Klotz M, Heeg K, Neumaier M, Werfel T, Renz H. TLR-2 polymorphism and altered TLR-2 signalling contribute to the pathogenesis of atopic dermatitis. National Eczema Workshop vom 27. -28.01.2006 in der Akademie Schloß Hohenkammer

DANKSAGUNG

Bei meinem Doktorvater Prof. Renz möchte ich mich herzlich für die Überlassung des sehr interessanten Themas, für die Aufgeschlossenheit meinen eigenen Ideen gegenüber sowie für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit unter ausgezeichneten Bedingungen durchführen zu können, bedanken. Danke vor allem auch für die Bereitstellung der am Ende hierfür erforderlichen Mittel und schließlich für die Gelegenheit, an wissenschaftlichen Tagungen teilnehmen zu dürfen. Ebenso gilt mein besonderer Dank Prof. Lingelbach aus der Abteilung Parasitologie Marburg für die Übernahme meiner Doktorarbeit als Erstgutachter. Prof. Heeg danke ich für die freundliche Aufnahme als assoziierte Wissenschaftlerin in seinem Institut für Medizinische Mikrobiologie und für die tiefen Einblicke in seiner Welt der Toll-like Rezeptoren. Ihm verdanke ich eine unermüdliche Diskussionsbereitschaft, viele inspirierende Denkanstöße, optimistische Worte und anregende Gespräche bezüglich meiner Arbeit. Mein Dank gilt ferner PD Dr. Dalpke für die Betreuung während dieser Zeit sowie den von mir sehr lieb gewonnenen Mitarbeitern Andrea Bätz, Christine Barrett und Markus Frey, die mir bei allen anfallenden theoretischen und praktischen Problemen, oder sei es auch nur um den üblichen Laborfrust loszuwerden, beistanden. Zudem bin ich Prof. Werfel der Hautklinik Hannover für die Bereitstellung von Patientenmaterial sowie für die sehr erfolgreiche und zuverlässige Kooperation äußerst dankbar. Ebenso möchte ich an dieser Stelle einen ganz großen Dank an Dr. Martina Klotz für die langwierige mikrobiologische Diagnostik der Hautabstriche sowie an den drei Powerfrauen Biggi, Annelie und Anita aus der Allergiediagnostik der Abteilung für die serologischen Antikörperbestimmungen der Patienten aussprechen. Christian Draing der Universität Konstanz verdanke ich schließlich die wertvollen LTAs. Für die nette und angenehme Arbeitsatmosphäre und oftmals tatkräftige Hilfestellung danke ich allen Kollegen der Abteilung. Dr. Holger Garn gilt mein herzlicher Dank für die kritische Durchsicht meiner Arbeit. Brigitte Auffarth danke ich für die exzellente Durchführung der FACS Analysen und den herausfordernden ELISA Aktionen zu Beginn der Promotion. Danke auch für das Korrekturlesen meiner Dissertation und für deine offene Tür bei so mancher spät gewordenen Stunde in Marburg. Die Zusammenarbeit mit dir bereitete mir stets große Freude. Ebenso möchte ich für die hervorragende technische Hilfe von Anka Wensing danken, die erheblich zur Etablierung der quantitativen PCR im humanen System beigetragen hat. Weiterhin bin ich der Auszubildenden Anika Rühl für die Durchführung der RNA Isolationen und RT Reaktionen dankbar, die besonders in der letzten Etappe meiner Arbeit häufig anfielen.

DANKSAGUNG

Auch danke ich allen Mitarbeitern, die mir stets geholfen haben, wenn ich mal wieder blutdurstig durch die Labore gezogen bin. Ihre zahlreichen Blutspenden haben diese Arbeit erst ermöglichen können. Meinen Freundinnen Mardjan und Ayşe danke ich besonders für die moralische Unterstützung und die unzähligen Diskussionen, durch die so manche große Probleme in kleine Widrigkeiten verwandelt wurden. Meiner geliebten Mutter danke ich jedoch zutiefst für ihr Vertrauen in mich, ihre bedingungslose und aufopfernde Unterstützung und ihre stetigen aufbauenden Worte, wenn ich glaubte, an meine Grenzen gestoßen zu sein. Ohne sie, hätte ich es bis hierhin nie geschafft. Meiner Familie, insbesondere meinem Vater, gebührt weiterhin der allergrößte Dank für den Rückhalt, die endlose Rücksichtnahme und Geduld während der Promotion, durch die meine Konzentration auf diese Arbeit nicht besser hätte gewährleistet sein können.

CURRICULUM VITAE

ANGABEN ZUR PERSON

Name:	Mrabet-Dahbi
Vorname:	Salima
Geburtsdatum:	05. Juni 1976
Geburtsort:	Kassel
Familienstand:	ledig
Eltern:	Brahim Mrabet-Dahbi (Glaser und Kunstglaser) Najat Achkari-Begdouri (Hausfrau)

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1982-1986:	Grundschule am Wall Kassel
1986-1988:	Förderstufe Carl-Schomburg Schule Kassel
1988-1993:	Goetheschule Gymnasium Kassel
1993-1994:	American School of Tangier in Marokko
1994-1996:	Goetheschule Gymnasium Kassel
06/1996:	Abitur

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

WS 1996/97:	Beginn des Diplom-Studiengangs Biologie an der Universität Kassel
10/1998:	Vordiplom in den Fächern Genetik, Mikrobiologie, Botanik, Zoologie, Chemie und Physik
01/2001:	Diplomprüfung in den Fächern Genetik, Biochemie, Humanbiologie und Bodenkunde
02/2001-10/2001:	Diplomarbeit in der Abteilung Zellbiologie unter Leitung von Prof. Maniak mit dem Titel "Biochemische Aufreinigung und Charakterisierung von Vesikeln des Endozytoseweges in <i>Dictyostelium discoideum</i> "
seit 03/2002:	Promotion in der Abteilung Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Renz